DILATATION DES RAUHEN ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS ALS MORPHOLOGISCHES KORRELAT EINER STÖRUNG IM PROTEINSTOFFWECHSEL

UNTERSUCHUNGEN AN FIBROBLASTEN MITTELS QUANTITATIVER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUTORADIOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Heike Niechoj
aus Gelsenkirchen

Düsseldorf 1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0062

DILATATION DES RAUHEN ENDOPLASMATISCHEN RETIKULUMS ALS MORPHOLOGISCHES KORRELAT EINER STÖRUNG IM PROTEINSTOFFWECHSEL

UNTERSUCHUNGEN AN FIBROBLASTEN MITTELS QUANTITATIVER ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER AUTORADIOGRAPHIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

HEIKE NIECHOJ
aus Gelsenkirchen

Düsseldorf 1987

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. E. Junger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1987

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	
II.1. Materialien	3
II.2. Zellzüchtung	6
II.3. Einbau von ^{3}H-Prolin in Protein	8
II.4. Markierung der Fibroblasten für die Autoradiographie	13
II.5. Morphologische Charakterisierung der Fibroblasten und elektronenmikroskopische Autoradiographie	14
II.5.1. Fixierung und Einbettung der Zellen	14
II.5.2. Herstellung der autoradiographischen Präparate	16
II.5.3. Probenauswahl	17
II.5.4. Analyse der Autoradiographien	19
III. Ergebnisse	
III.1. Wachstumsbedingungen und Morphologie der Zellen	23
III.2. Biochemische Untersuchungen	27
III.3. Quantitative elektronenmikroskopische Autoradiographie	29
IV. Diskussion	
IV.1. Methodische Überlegungen	32
IV.2. Morphologische Veränderungen des rER	37
IV.3. Verlauf der Proteinsynthese in Fibroblasten mit normalem rER	41
IV.4. Verlauf der Proteinsynthese in Fibroblasten mit erweitertem rER	48

Seite

V. Zusammenfassung 53

VI. Literaturverzeichnis 55

VII. Abkürzungsverzeichnis 78

VIII. Abbildungen 79

IX. Tabellen 116

I. Einleitung

Morphologische Veränderungen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) in Form von Cisternenerweiterungen und Lumenvergrößerungen wurden für verschiedene Gewebe im Zusammenhang mit Gefäß- und/oder Stoffwechselerkrankungen beschrieben. Es interessiert daher, inwieweit sie Folge oder Ausdruck einer bestimmten Stoffwechselstörung sind.

So wurde eine Erweiterung des rER in vivo z.B. in arteriellen glatten Muskelzellen bei arteriosklerotischen Kaninchen (Parker, Odland, 1966), sowie in Endothelzellen arteriosklerotischer Gefäßwände bei Hunden (Geer, 1965) und in Endothelzellen von Coronararterien mit Frühveränderungen bei Kaninchen (Backwinkel et al., 1970) beschrieben.

In sehr deutlich ausgeprägter Form fanden sich diese morphologischen Veränderungen auch in vitro bei Fibroblasten. Auch hier wurden sie wieder im Zusammenhang mit einem pathologischen Geschehen beobachtet. Miller et al. (1968) und Maug (1981) haben sie bei Spendern, bei denen sich eine Stoffwechselerkrankung manifestiert hatte, beschrieben.

Eine Erweiterung des rER läßt sich aber auch bei Fibroblasten von gesunden Spendern induzieren, z.B. durch lang andauernde Kultur konfluenter Fibroblasten (Comings, Okada, 1970; Lucky et al., 1975) oder durch Ascorbinsäuremangel (Schafer et al., 1967).

Aus früheren Arbeiten ergaben sich wenig befriedigende Interpretationen zur Bedeutung dieses Phä-

nomens. Chapman (1962) sieht beispielsweise die erweiterte Form des rER nicht als einen Ausdruck einer gestörten Stoffwechselfunktion sondern als charakteristisches Merkmal collagensynthetisierender Zellen. Geer (1965) deutet die Cisternenerweiterung als Folge einer gesteigerten Stoffwechselaktivität.

Weiterführende Hinweise für die mögliche Ursache der morphologischen Veränderungen des rER ergaben sich erst aus der Aufklärung der Biosynthese von Collagen (Prockop et al., 1979, Review). Von den wichtigen post-translationalen Prozessen findet z.B. die enzymatische Hydroxylierung im rER statt. Als Cofaktoren sind dabei Fe-Ionen, O_2, α-Ketoglutarsäure und Ascorbinsäure essentiell. Bei Fehlen eines dieser Faktoren - z.B. Ascorbinsäure (Stone, Meister, 1962; Bates et al., 1972; Blanck, Peterkofsky, 1975; Kao et al., 1977) - ist zuerst die Sekretion von Procollagen verzögert und längerfristig die Synthese vermindert.

Die in kultivierten Fibroblasten beobachtete Erweiterung des rER könnte eine Folge eines verzögerten Abtransportes von Procollagen aus dem rER sein.

Diese Hypothese sollte am Modell von menschlichen Hautfibroblasten, bei denen die morphologischen rER-Veränderungen experimentell induziert wurden, überprüft werden. Als Tracer-Aminosäure für die Proteinsynthese unter besonderer Berücksichtigung der Collagensynthese wurde ^{3}H-Prolin eingesetzt. Die Synthese von markierten Proteinen und deren Transport durch die Zelle wurde mittels quantitativer elektronenmikroskopischer Autoradiographie verfolgt.

II. Material und Methoden

II.1. Materialien

"Tracer"

L-[2,3,4,5-^{3}H]-Prolin, spez. Akt. 100 Ci/mmol, 5 mCi/ml, Amersham, Braunschweig, BRD

Zellkulturmedien

Dulbecco's Modification des Eagle'schen Mediums (DMEM), Seromed, München, BRD:

Medienzusammensetzung in mg/l:

NaCl	6400	L-Phenylalanin	66
KCl	400	L-Threonin	95
$CaCl_2$	200	L-Tryptophan	16
$MgSO_4 7H_2O$	200	L-Tyrosin	72
NaH_2PO_4	124	L-Valin	94
D-Glucose	1000	Glycin	30
$Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$	0,1	L-Serin	42
Na-Pyruvat	110	Cholinchlorid	4
Phenolrot	15	Folsäure	4
L-Arginin·HCl	84	i-Inosit	7,2
L-Cystin	48	Nicotinamid	4
L-Histidin·HCl	42	D-Ca-Pantothenat	4
L-Isoleucin	105	Pyrodoxal·HCl	4
L-Leucin	105	Riboflavin	0,4
L-Lysin·HCl	146	Thiamin·HCl	4
L-Methionin	30		

Mediumherstellung: 10 ml L-Glutamin (29,24 g/l)
+ 24,65 ml $NaHCO_3$ (75 mg/l)
+ 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E./ml)
ad 500 ml Medium

Fötales Kälberserum (FCS), Seromed, München, BRD

Normalserum (NS): Humanserum, gewonnen aus dem Blut von 6-10 stoffwechselgesunden Personen

Trypsin-EDTA-Lösung (10-fach-Konzentrat): 0,5 % Trypsin und 0,2 % EDTA in physiologischer Kochsalzlösung, GIBCO EUROPE, Karlsruhe, BRD

Versenpuffer: 0,44 g KCl
+ 0,64 g $NaHCO_3$
ad 900 ml Aqua bidest
eingestellt mit HCl auf pH 7,4

Trypsin in Versenpuffer: 100 ml Trypsin-EDTA-Lösung (10-fach-Konzentrat)
+ 900 ml Versenpuffer

"Pulse"-Medium:

DMEM
+ 1 % NS oder
10 % NS + L-Ascorbinsäure (50 µg/ml = $2,84 \times 10^{-4}$ mol/l)
+ ^{3}H-Prolin (50 µCi bzw. 500 µCi/ml)

"Chase"-Medium:

DMEM
+ 1 % NS oder
10 % NS + L-Ascorbinsäure (50 µg/ml = $2,84 \times 10^{-4}$ mol/l)

Reagenzien für die Fixierung und Einbettung

Cacodylsäure, Na-Salz, Merck, Darmstadt, BRD

Glutaraldehyd (25 %ige wässrige Lösung), Serva-Feinbiochemica, Heidelberg, BRD

OsO_4, Serva-Feinbiochemica, Heidelberg, BRD

Äthanol p.A., Merck, Darmstadt, BRD

Uranylacetat, Merck, Darmstadt, BRD

Phosphorwolframsäure, Merck, Darmstadt, BRD

Epon: Epon 812
+ Dodecenylbernsteinsäureanhydrid (DDSA)
+ Methylnadicanhydrid (MNA)
+ 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)phenol (DMP-30)
Serva-Feinbiochemica, Heidelberg, BRD

Photochemikalien

Kernspuremulsion: L 4, Ilford Ltd., Basildon, Essex, England

Entwickler: Mikrodol X, Kodak, Rochester, U.S.A.

Fixierer: 20 g Natrium-Thiosulfat
+ 2,5 g Kalium-Bisulfit
+ 77,5 g Aqua bidest
Merck, Darmstadt, BRD

Sonstige Reagenzien

Scintillationslösung: Quickscint, Zinsser Analytic, Frankfurt, BRD

Formvar, Serva-Feinbiochemica, Heidelberg, BRD

Geräte

Brutschrank: Heraeus, Hanau, BRD

Coulter-Counter: Z B_I, Coulter, Krefeld, BRD

Ultramikrotom: Om U 3, Reichert, Wien, Österreich

Elektronenmikroskop: Elmiskop I A, Siemens, Berlin, BRD

ß-Counter: Berthold, Köln, BRD

Sonstige Materialien

Gewebekulturschalen: Falcon, 35 x 15 mm, Seromed, München, BRD

Kupfernetzchen: Veco, Solingen, BRD

UNIV. LEIDEN BIBL.

II.2. Zellzüchtung

Zur Untersuchung gelangten menschliche Hautfibroblasten aus ca. 4x4 mm großen Gewebsstückchen, die durch eine Hautbiopsie aus der Regio deltoidea am Oberarm eines stoffwechselgesunden Spenders (männlich, Alter 19 Jahre) steril entnommen, zerkleinert und in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen worden waren.

Die Explantate wurden in sterile Petrischalen mit Dulbecco's Modification des Eagle'schen Mediums (DMEM) + 10 % fötalem Kälberserum (FCS) überführt und mit Deckplättchen abgedeckt. Die Anzüchtung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C unter CO_2-Begasung (5 % CO_2). Der Mediumwechsel wurde zweimal pro Woche durchgeführt.

Nach 30 Tagen Wachstum bis zur Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05 % Trypsin in Versenpuffer, pH 7,4, 5 Minuten bei 37 °C von der Unterfläche gelöst und in Gewebekulturschalen (35 mm Durchmesser ≙ 9,6 cm^2 Bodenfläche) überführt.

Nach der ersten Trypsinierung erfolgte die weitere Anzüchtung in DMEM + 10 % Normalserum, das von jeweils 6-10 stoffwechselgesunden Personen (NS) stammte.

Nach der 4. Passage wurden die Fibroblasten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -196 °C bis zur weiteren Verwendung bis zu etwa 3 Jahre gelagert. Für die elektronenmikroskopischen, biochemischen und autoradiographischen Untersuchungen wurden die Zellen aufgetaut und in DMEM + 10 % NS bis zur 6. Passage unter den oben angegebenen Bedingungen weitergezüchtet.

Zur Klärung der Kulturbedingungen, die zur Erweiterung des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) in menschlichen Fibroblasten führen, erfolgte die Züchtung unter folgenden Bedingungen:

a) bei hoher Serumkonzentration nach Ansetzen mit einer Zelldichte von 3-4 x 10^4 Zellen/Schale in DMEM + 10 % NS für die Dauer von 3, 6, 10 und 13 Tagen, ohne bzw. mit Zugabe von Ascorbinsäure (50 µg/ml) am 10. Versuchstag

b) bei niedriger Serumkonzentration durch Ansetzen in DMEM + 10 % NS vom 1.-3. Versuchstag und Inkubation in DMEM + 1 % NS vom 4.-6. Versuchstag, ohne Zugabe von Ascorbinsäure.

II.3. Einbau von ^{3}H-Prolin in Protein

Der Einbau von ^{3}H-Prolin in Protein wurde an Fibroblasten mit normalem (a) und erweitertem (b) rER durch "Pulse-Chase"-Experimente in folgender Weise untersucht (zum Versuchsablauf siehe auch Tafel 1 auf S. 11,12):

Die Anzucht der Zellen a) mit normalem rER erfolgte in je 2 ml DMEM + 10 % NS 6 Tage lang mit Mediumwechsel und Ascorbinsäurezugabe (50 µg/ml) am 3. und 5. Tag (Schafer et al., 1967; Comings, Okada, 1970).

Die Anzucht der Zellen b) mit erweitertem rER erfolgte die ersten 3 Tage in je 2 ml DMEM + 10 % NS. Dann wurde das Medium durch DMEM + 1 % NS ohne Ascorbinsäurezugabe ersetzt.

24 Stunden vor Versuchsbeginn, am 5. Tag, erfolgte bei beiden Zellansätzen der letzte Mediumwechsel. Das Volumen wurde auf 1 ml pro Schale reduziert.

Die ^{3}H-Prolin-Aufnahmerate der Fibroblasten hängt von der Wachstumsphase der Zellen ab, wobei die höchste Aufnahmerate während der log-Phase der Zellvermehrung vorliegt (vgl. Peterkofsky, 1972), um dann bei konfluenten Zellen mit zunehmender Konfluenzdauer linear abzunehmen. Um eine möglichst hohe Aufnahmerate von ^{3}H-Prolin während der Versuche zu erzielen, wurden die biochemischen Versuche und die Markierungen für die Autoradiographien zum Zeitpunkt kurz vor Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase durchgeführt, bei Zellzahlen um 250.000 Fibroblasten/Schale. Für die angegebene Schalengröße bilden die Fibroblasten bei etwa 300.000 Zellen/Schale einen konfluenten Zellmono-

layer. Da bei Zellen, bei denen der Serumgehalt des Mediums nach 3 Tagen auf 1 % NS reduziert wurde, durch die minimale Nährstoffversorgung eine deutliche Verzögerung des Wachstums eintrat (Douglas et al., 1976), wurden beide Ansätze mit verschieden hohen Zellzahlen gestartet (30.000 bzw. 40.000 Zellen), um am Versuchstag etwa vergleichbare Zellzahlen zu erreichen.

Die radioaktive Markierung der Zellen erfolgte in einem 5-Minuten-"Pulse" mit 50 µCi/ml ^{3}H-Prolin (= 5 x 10^{-7} mol/l) bei 37 °C. Danach wurden die Zellen innerhalb von 20-30 Sekunden 6 mal in je 2 ml PBS bei 37 °C gewaschen. Im darauffolgenden "Chase" wurden die Fibroblasten dann in je 2 ml entweder a) DMEM + 10 % NS + Ascorbinsäure oder b) DMEM + 1 % NS für 0, 15, 30 Minuten, 1, 2, 5, 10 und 24 Stunden bei 37 °C weiterinkubiert.

Zur Messung des ^{3}H-Prolin-Protein-Gehaltes im Medium wurden am Ende der "Chase"-Zeiten aus jeder Schale 1,5 ml Kulturmedium entnommen und zunächst auf 0 °C abgekühlt.

Zur Messung des ^{3}H-Prolin-Proteins in den Zellen wurden die Monolayer am Ende der jeweiligen "Chase"-Zeit 4 mal in je 2 ml PBS bei 0 °C gewaschen und dann mit je 1 ml 0,05 % Trypsin in Versenpuffer 5 Minuten bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspension wurde abpipettiert, die Kulturschalen mit 1 ml DMEM + 10 % FCS nachgespült und die Proben auf 0 °C abgekühlt.

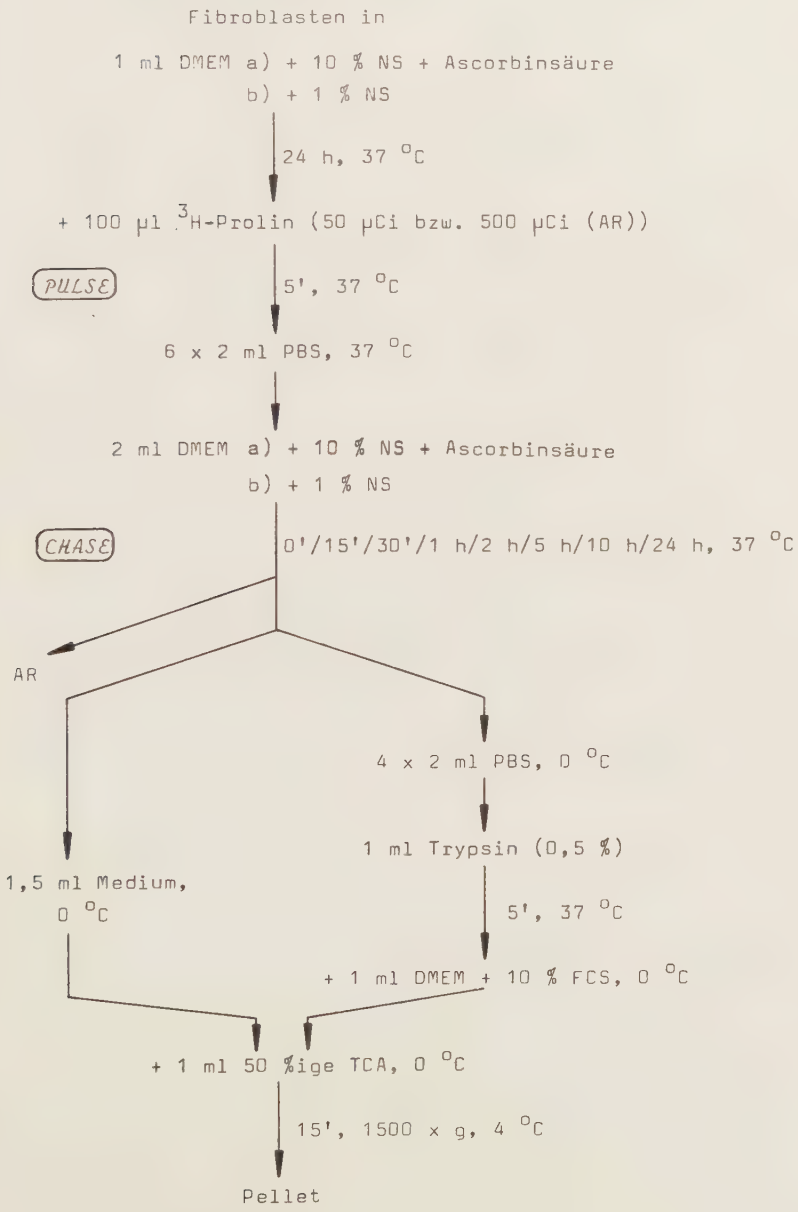
Im folgenden wurden die Medium- und die Zellproben wieder in gleicher Weise aufgearbeitet: Zur Proteinfällung wurden je 1 ml eiskalte 50 %ige Trichloressigsäure (TCA) zu 2 ml Zellsuspension bzw. zu 1,5 ml Medium zugefügt und 10-15 Sekunden geschüttelt. Der Proteinniederschlag wurde 15 Minuten bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand

wurde verworfen und das Pellet unter Zugabe von 2 ml Äther/Äthanol (1:1) mit dem Glasstab zerkleinert. Mit weiteren 2 ml Äther/Äthanol (1:1) wurde der Glasstab abgespült, die Probe gemischt und nach 5 Minuten Inkubation bei 20 °C erneut 15 Minuten bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Äther/Äthanol-Wäsche wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde in 200 µl 1 N NaOH 60 Minuten lang bei 56 °C gelöst und nach Verdünnung mit 800 µl H_2O wurde die Radioaktivität von 800 µl der Probe in 15 ml Scintillationslösung im β-Counter 10 Minuten lang gemessen und in cpm registriert.

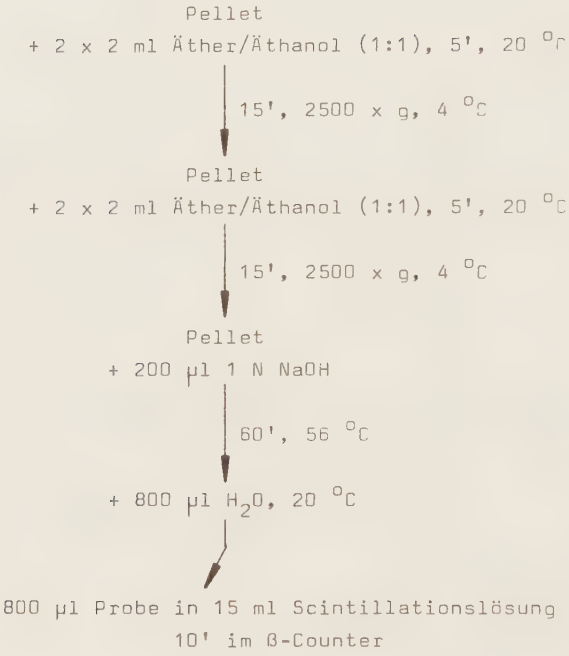
In Parallelansätzen wurde die Zellzahl pro Schale zum Versuchszeitpunkt mit dem Coulter-Counter ermittelt.

Aus jeweils drei Parallelproben wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Tafel 1: Versuchsablauf zur Messung von ^{3}H-Prolin-Protein in Zellen und Inkubationsmedium



Tafel 1: Fortsetzung



II.4. Markierung der Fibroblasten für die Autoradiographie

Die Anzucht der Fibroblasten für die elektronenmikroskopische Autoradiographie wurde parallel und in gleicher Weise wie für die biochemischen Untersuchungen durchgeführt (s. II.3.).

Die radioaktive Markierung der Fibroblasten erfolgte in einem 5-Minuten-"Pulse" mit 500 µCi ^{3}H-Prolin/ml (= 5 x 10^{-6} mol/l) mit anschließendem "Chase" von 15, 30, 60, 120 Minuten jeweils in den gleichen Medien wie bei den biochemischen Untersuchungen.

Zur Messung der ^{3}H-Prolin-Aufnahme in die Fibroblasten wurden die Zellmonolayer unmittelbar nach dem "Pulse" wie oben beschrieben 6 mal bei 0 °C gewaschen, bei 37 °C abtrypsiniert und 10 Minuten bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 1 N NaOH 60 Minuten lang bei 56 °C gelöst und nach Verdünnung mit 800 µl H_2O wurden 100 µl der Probe in 15 ml Scintillationslösung im β-Counter 10 Minuten lang gemessen. Die ^{3}H-Prolin-Aufnahmeraten sind zusammen mit den jeweiligen Zellzahlen pro Kulturschale in Tabelle 2 aufgeführt.

II.5. Morphologische Charakterisierung der Fibroblasten und elektronenmikroskopische Autoradiographie

II.5.1. Fixierung und Einbettung der Zellen

Für Untersuchungen über den Einfluß der Kulturbedingungen auf die Feinstruktur der Zellen, sowie nach Ablauf der jeweiligen "Chase"- und Inkubationszeiten wurden die Fibroblasten für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weiter aufgearbeitet:

Fixierung:	4 % Glutaraldehyd in 0,143 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,3 680 mosmol/kg; 1 h bei 4 °C
Waschen:	0,143 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,3 280 mosmol/kg; 2 x 10 Minuten bei 4 °C
Nachfixierung:	2 % OsO_4 in 0,143 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,3 345 mosmol/kg; 1 h bei 4 °C
Waschen:	0,143 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,3 280 mosmol/kg; 2 x 10 Minuten bei 4 °C
Entwässerung:	30 %, 50 %, 70 %, 2 x 90 %, 3 x abs. Äthanol jeweils 10 Minuten bei 20 °C, dabei
Kontrastierung:	1,5 % Uranylacetat + 1,5 % Phosphorwolframsäure in 70 % Äthanol 2 x 1 h bei 20 °C
Einbettung:	Epon/Äthanol 1:1, 30 Minuten bei 20 °C Epon/Äthanol 2:1, 30 Minuten bei 20 °C Epon, 3 x 30 Minuten bei 20 °C Polymerisation des Kunstharzes 24 h bei 40 °C und 48 h bei 60 °C

Nach 24-stündiger Aushärtung bei 60 °C wurden die Eponplatten aus den Kulturschalen entnommen und weitere 24 Stunden bei 60 °C auspolymerisiert. Danach wurden die Eponplatten halbiert. Entlang der Schnittkante wurden 5 Blöckchen mit je einer Bodenfläche von etwa 4 mm x 3 mm herausgesägt und mit einer scharfen Klinge angespitzt, wobei eine 5 mm breite Randzone der Eponplatte wegen häufiger mechanischer Einflüsse in diesem Bereich (Mediumwechsel, Waschen) unberücksichtigt blieb. Von den Blöckchen wurden am Ultramikrotom mit einem Diamantmesser jeweils parallel zum Zellmonolayer Ultradünnschnitte angefertigt, deren Schnittdicke nach der Interferenzfarbe auf der Wasseroberfläche bei ca. 500 Å lag.

Zur morphologischen Charakterisierung der Fibroblasten am Elektronenmikroskop wurden die Ultradünnschnitte auf hexagonale Kupfernetzchen aufgetragen, welche zuvor mit Formvar als Trägerschicht befilmt und mit Kohle bedampft worden waren.

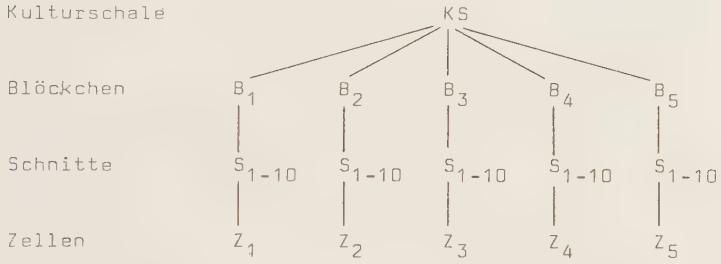
II.5.2. Herstellung der autoradiographischen Präparate

Für die elektronenmikroskopische Autoradiographie wurden die Schnitte mittels einer Glaskugel (abgeschmolzene Glaskapillare) aufgenommen und auf Glasobjektträger übertragen (Salpeter, Bachmann, 1964), die mit einer Trägerschicht aus 1 % Collodium in Essigsäurebutylester (Schichtdicke nach Interferenzmessung ca. 1500 Å) befilmt worden waren. Nach der Bedampfung mit einer Kohleschicht von 2,5-5 nm (Salpeter, Bachmann, 1964) wurden die Präparate mit Ilford L 4 Kernspuremulsion nach der Auftropfmethode (Bachmann, Salpeter, 1973) befilmt. Die Bedingungen wurden so abgestimmt, daß dichtgepackte Silberhalogenid-Monoschichten (1500 Å, Interferenzfarbe Purpur) erhalten wurden (Salpeter, Bachmann, 1965). Die gleichmäßige Verteilung der Silberhalogenid-Körner wurde elektronenmikroskopisch überprüft (Abb. 1, vgl. Caro et al., 1962; Bachmann, Salpeter, 1965). Die Schichtdicke wurde während der Befilmung regelmäßig an Hand der Interferenzfarbe (Purpur) kontrolliert.

Die Präparate wurden bei 4 °C 6 Wochen exponiert und anschließend in Mikrodol X 4 Minuten bei 22 °C entwickelt (Kopriwa, 1975). Nach dem Fixieren in Natrium-Thiosulfat/Kalium-Bisulfit 2 Minuten lang bei 22 °C und Wässern wurde die Trägerschicht mit den Schnitten auf die Wasseroberfläche abflotiert und auf hexagonal-maschige Kupfernetzchen übertragen (Abb. 2).

II.5.3. Probenauswahl

Pro "Chase"-Dauer lagen 2 Kulturschalen vor, davon wurde jeweils eine nach folgendem Schema weiter aufgearbeitet:



Für die quantitative Analyse wurden nur solche Schnitte ausgewählt, deren Schnittdicke in einem mittleren Bereich von 500-600 Å lagen. Die Schnittdicken wurden jeweils interferometrisch durch Messung der Auslenkung von Interferenzstreifen am Schnitt bei Grünlicht der Wellenlänge λ = 546 nm (Salpeter, Bachmann, 1972) ermittelt.

Wie im Schema angegeben, wurde im Elektronenmikroskop je Eponblöckchen ein Schnitt und je Schnitt ein Zellquerschnitt aus dem mittleren Bereich des Zellkerns ausgewählt und photographiert, so daß schließlich für jede "Chase"-Dauer sowohl für Fibroblasten mit normalem rER als auch für Fibroblasten mit dilatiertem rER je 5 vollständige Querschnitte von je 5 unterschiedlichen Zellen ausgewertet vorlagen.

Zur Darstellung des vollständigen Zellquerschnitts waren 10-15 Aufnahmen bei einer etwa 4000-fachen

Negativvergrößerung notwendig. Während des Mikroskopierens wurden die Linsenströme registriert und die Vergrößerung für jede Fotoserie mittels eines Gitterpräparates mit bekanntem Gitterabstand geeicht. Zur Auswertung wurden Abzüge mit einer Endvergrößerung von 16.000 x angefertigt und zu einem Gesamtzellquerschnitt montiert.

II.5.4. Analyse der Autoradiographien

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der autoradiographischen Präparate zeigen die Ultrastruktur der Fibroblasten, sowie die entwickelten Silberkörner, die in der Gelatineschicht der Emulsion liegen. Die entwickelten Silberkörner liegen nicht notwendigerweise unmittelbar über den Strahlquellen. Sie liegen jedoch mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit innerhalb einer charakteristischen Distanz von der Strahlquelle (Abb. 3) (Nadler, 1971; Blackett, Parry, 1973; Salpeter et al., 1978).

Die Wahrscheinlichkeit, mit der Silberkörner in bestimmten Abständen um eine Strahlquelle gefunden werden, wird als "autoradiographische Auflösung" bezeichnet und wird in der Regel als Dichtefunktion dargestellt. Dieser Parameter ist abhängig von der Energie der β-Strahlung, der Geometrie der Probe und dem photographischen Prozeß (Bachmann et al., 1968; Salpeter et al., 1969).

Als Maß für die autoradiographische Auflösung dient die "Halbwertsdistanz" (HD) und der davon abgeleitete "Halbwertsradius" (HR). Das ist der Radius, der eine Kreisfläche um eine Punktquelle definiert, innerhalb der 50 % aller Silberkörner beobachtet werden, die von einer punktförmigen Quelle verursacht worden sind. Der HR-Wert beträgt für die vorliegenden Versuchsbedingungen (^3H, Schnittdicke 50 nm, Ilford L 4 Monoschicht, Mikrodol-X-Entwicklung) 245 nm, entsprechend 3,9 mm bei 16.000-facher Vergrößerung für die Auswertung (Williams, 1977). Wird der HR-Kreis um ein Silber-

korn gelegt, kann umgekehrt geschlossen werden, daß die Strahlquelle mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit innerhalb der vom HR-Kreis umschlossenen Fläche liegt.

Diese "Wahrscheinlichkeitskreise" bilden die Basis einer häufig angewandten Analysemethode für Autoradiographien, die auch für diese Arbeit benutzt wurde und als "circle method" bekannt ist (Williams, 1977).

Im Rahmen dieser Methode wurden in folgender Weise Daten gesammelt:

1. Registrierung der "reellen" Silberkörner: Zunächst wurde unter Verwendung einer transparenten Maske um jedes Silberkorn der HR-Kreis gelegt (Abb. 7). Dabei wurde jeweils als Mittelpunkt des Silberkorns der Mittelpunkt seiner längsten Achse definiert (Abb. 7, Ausschnitt). Zellkompartimente, die in diesem HR-Kreis lagen, wurden registriert. Dazu waren zuvor für Fibroblasten folgende "primäre Kompartimente" definiert worden (Abb. 4):

GP - Grundcytoplasma
rER - rauhes endoplasmatisches Retikulum
GO - Golgi-Apparat
PP - peripheres Cytoplasma
MI - Mitochondrien
N - Kern
EX - Extrazellulärraum.

Da bei der Auswertung in einem HR-Kreis häufig zwei oder drei aneinandergrenzende Kompartimente gleichzeitig erfaßt wurden, wurden außerdem sogenannte "kombinierte Kompartimente" definiert (Abb. 5, 6):

rER/GP, rER/PP, GO/GP, PP/EX, MI/GP, MI/PP, N/GP, rER/GO/GP, rER/MI/GP, rER/MI/PP, rER/N/GP, GO/MI/GP, GO/N/GP, N/MI/GP.

Silberkörner im Extrazellulärraum wurden bei der Auswertung zwar zunächst erfaßt, sie wurden aber wegen mangelnder Abgrenzungsmöglichkeiten des Kompartiments nicht in die Tabellen aufgenommen.

2. Registrierung der "hypothetischen" Silberkörner: Als nächster Schritt wurden über den Zellquerschnitten durch Auflegen einer transparenten Maske mit einem regelmäßigen Raster von HR-Kreisen (Abstand 3 cm, Abb. 8) in gleicher Weise Zellkompartimente bestimmt. Die Häufigkeitsverteilung der durch die HR-Kreise statistisch selektierten Kompartimente gibt ein Maß über die zu erwartende Häufigkeitsverteilung von Silberkörnern bei einer Zufallsverteilung des Tracers über dem gesamten Zellquerschnitt (Williams, 1977) und einen Schätzwert für die relativen Flächenanteile der Zellkompartimente.

Wenn die ermittelte Anzahl von HR-Kreisen und reellen wie hypothetischen Silberkörnern bei einigen kombinierten Kompartimenten für die weitere Analyse zu niedrig lag, wurden die Einzeldaten in Gruppen zusammengefaßt (Williams, 1977), wie in den Tabellen 5-20 im Anhang dargestellt.

Die Verteilung der "reellen", beobachteten Silberkörner und die der normierten "hypothetischen" wurde im χ^2-Test miteinander verglichen, um zu ermitteln, ob die empirische Silberkorn-Verteilung von einer Zufallsverteilung abweicht oder nicht.

Eine grobe Schätzung relativer spezifischer Aktivitäten der Quellenkompartimente ergibt sich nach Normierung aus dem Quotienten der tatsächlich beobachteten Silberkörner zu den für eine Zufallsverteilung zu erwartenden.

Von jeweils 5 ausgewerteten Zellen wurden für die

relativen spezifischen Aktivitäten die Mittelwerte und die Standardabweichung nach $\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - n\bar{x}^2}{n}}$ berechnet. Diese Werte geben an, ob in dem jeweiligen Kompartiment eine Akkumulation von markiertem Material vorliegt (rel. spez. Akt. > 1), ob markiertes Material entsprechend dem Flächenanteil des Kompartimentes an der Gesamtfläche der Zelle verteilt ist (rel. spez. Akt. = 1) oder ob das jeweilige Kompartiment weniger Silberkörner enthält als seiner flächenmäßigen Verteilung entspricht (rel. spez. Akt. < 1). Dabei deuten sehr hohe Werte für die relative spezifische Aktivität auf hohe Konzentrationen des radioaktiven Materials in dem betreffenden Kompartiment.

III. Ergebnisse

III.1. Wachstumsbedingungen und Morphologie der Zellen

Als Standard für morphologische Veränderungen wurde die Ultrastruktur von Fibroblasten herangezogen, die unter ausreichender Nährstoffversorgung (Kulturbedingungen a) bis zu einer geringen Zelldichte (bis ca. 250.000 Zellen/Schale bei durchschnittlich 6 Tagen Kulturdauer) gezüchtet worden waren. Die charakteristischen Merkmale waren folgende:

Der zentral gelegene, ovale bis nierenförmige Kern zeigte homogen verteiltes Chromatin und enthielt einen oder mehrere Nucleoli. Die von Kernporen durchsetzte Kernmembran (Abb. 7, 10) stand in Verbindung zum rauhen endoplasmatischen Retikulum.

Das rER stellte sich dar als ein verzweigtes System aus schmalen Cisternen und abgeflachten Kanälen mit mäßig elektronendichtem Inhalt und einer Lumenweite von ca. 1000 Å (Abb. 9, 15). Die Elemente des glatten endoplasmatischen Retikulums befanden sich zwischen dem rER und dem Golgi-Apparat, wobei die Übergänge vom rauhen zum glatten ER oft fließend waren (Abb. 10).

Der Golgi-Apparat lag im juxtanucleären Bereich mit den geschichteten Dictyosomen und zahlreichen glatten Vesikeln (Abb. 10).

Die Membranen des rER waren mit Ribosomen besetzt, deren spiralförmige Anordnung in Anschnitten, die parallel zur Membran verliefen, sichtbar wurde (Abb. 10). Der Hauptanteil der Ribosomen befand

sich cytosolisch in Form von Polysomen im restlichen Cytoplasma verteilt (Abb. 9).

Die zahlreichen Mitochondrien hatten längliche, oft verweigte Gestalt mit zahlreichen Cristae transversales (Abb. 9).

Ebenso wie die Lipidtropfen von unterschiedlicher Elektronendichte und die mit zunehmendem Zellalter häufiger auftretenden Lysosomen (Abb. 9, 17) konzentrierten sich die Zellorganellen im perinukleären Bereich.

Die Zellausläufer enthielten in der Regel lediglich freie Ribosomen und waren von einem Netz von Mikrotubuli und Mikrofilamenten durchzogen (Abb. 9). Parallel zur Zellmembran waren die Mikrofilamente in dickeren Bündeln angeordnet, die oft durch einen Fibronexus mit der extrazellulären Matrix und darüber offenbar mit dem Cytoskelett der Nachbarzellen in Verbindung standen.

Entlang dieser Filamentbündel sowie der Plasmamembran befanden sich zahlreiche Vesikel (Abb. 9), die z.T. mit der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran und z.T. untereinander in Verbindung standen. Auf der Plasmamembran außen aufgelagert war fibrilläres Material in unterschiedlicher Menge (Abb. 29).

In Abhängigkeit von der Kulturdauer (3-13 Tage) und den Kulturbedingungen (a und b, s.S. 7) wurden morphologische Veränderungen insbesondere des rER registriert. In ihrer Qualität lassen sich diese Veränderungen wie folgt charakterisieren:

Bei den Veränderungen des rER handelte es sich um eine unterschiedlich starke Erweiterung des Lumens der rER-Cisternen. So entstanden rER-Dilatationen mit unregelmäßiger äußerer Form (Abb. 12),

sowie kugelig geblähtes rER mit homogenem oder granulärem Inhalt (Abb. 13), wobei auch Konzentrationen des elektronendichten granulären Inhaltes in der Lumenmitte zu beobachten waren (Abb. 11). Solche verschiedenen rER-Formen traten auch nebeneinander innerhalb einer Zelle auf (Abb. 11). In unmittelbarer Kernnähe hatte das rER noch häufig die normalen, schmalen Cisternen (Abb. 23 a).

Unter ausreichender Nährstoffzufuhr aber ohne Ascorbinsäurezugaben (Kulturbedingungen a, s.S. 7) entwickelten sich die morphologischen Veränderungen relativ langsam, wie die elektronenmikroskopische Studie zum zeitlichen Verlauf über 13 Tage zeigt:

Fibroblasten, die in DMEM + 10 % NS angesetzt worden waren, hatten sich am *3. 7ag* soweit vermehrt, daß etwa 20-30 % des Schalenbodens mit Zellen bedeckt war (Abb. 14). Zu dieser Zeit befanden sich die Fibroblasten in der logarithmischen Wachstumsphase. Sie besaßen ein homogenes Cytoplasma mit spärlich vertretenen Organellen im perinucleären Bereich und in den Ausläufern im wesentlichen nur Polysomen. Das rER war zu diesem Zeitpunkt nicht erweitert (Abb. 15).

Am *6. 7ag* nach Versuchsbeginn war etwa 80-90 % des Schalenbodens mit Fibroblasten bedeckt (Abb. 16). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte bei den Fibroblasten der Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase. Das zellkernnahe Cytoplasma war nun reicher an verschiedenen Zellorganellen, insbesondere an Lysosomen. Das endoplasmatische Retikulum hatte zu diesem Zeitpunkt noch in fast allen Zellen seine ursprüngliche Dimension (Abb. 17).

Am *10. 7ag*, nach Erreichen der 100 % Konfluenz bei stationärer Wachstumsphase (Abb. 18), traten bei

80-90 % der Zellen Erweiterungen des rER auf (Abb. 19).

Am *13. Versuchstag* war die Dilatation des rER in allen Zellen nachweisbar (Abb. 20). Zu diesem Zeitpunkt traten zunehmend lysosomale Körper auf.

Diese rER-Veränderungen (Abb. 19 a, 20) waren reversibel nach einer einmaligen Zugabe von 50 µg Ascorbinsäure/ml Inkubationsmedium vom 10.-13. Versuchstag (Kulturbedingungen a, s.S. 7; Abb. 21). Eine Zugabe von nur 5 µg Ascorbinsäure/ml Inkubationsmedium reichte dagegen zur Rückbildung der rER-Veränderungen nicht aus.

Wesentlich früher waren die Veränderungen des rER unter den Kulturbedingungen b zu beobachten. Ca. 90 % der Fibroblasten, die unter Nährstoffmangel gezüchtet wurden, zeigten bereits am 6. Tag ein dilatiertes rER (Abb. 22).

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die biochemischen Versuche und die radioaktiven Markierungen für die Autoradiographien 6 Tage nach Zellansatz durchgeführt. Es lagen damit zum Versuchszeitpunkt Fibroblasten mit erweitertem rER vor, die vom 3. Tag an in DMEM + 1 % NS gewachsen waren (Abb. 23 a), sowie Zellen mit normalem rER als Kontrollzellen, die 6 Tage in DMEM + 10 % NS unter Zugabe von Ascorbinsäure gezüchtet worden waren (Abb. 23 b).

III.2. Biochemische Untersuchungen

Nach den in I.3. angegebenen Kulturbedingungen wurden Fibroblasten a) mit normalem und b) mit dilatiertem rER für 5 biochemische Versuche angezüchtet.

Die Zellzahlen lagen mit einer Ausnahme sowohl bei Fibroblasten mit dilatiertem rER als auch bei den Kontrollzellen um 250.000 Fibroblasten/Schale (Tab. 2). Dabei war die Schwankungsbreite an den einzelnen Versuchstagen sehr gering.

Parallel zu den Markierungs-Ansätzen für die Autoradiographien wurde die Aufnahme von ^{3}H-Prolin in die Zellen nach einem 5-Minuten-"Pulse" mit 500 µCi ^{3}H-Prolin/ml gemessen. Bei den einzelnen Versuchen waren die ^{3}H-Prolin-Aufnahmeraten, gemessen in cpm/10^{5} Zellen, unterschiedlich hoch (Tab. 2). Sie waren bei den Fibroblasten mit dilatiertem rER aber bei allen Versuchen deutlich (im Durchschnitt um 46 %) niedriger als bei den Kontrollzellen mit normalem rER.

Nach einem 5-Minuten-Pulse mit 50 µCi ^{3}H-Prolin/ml wurde der Einbau von ^{3}H-Prolin in Protein in den Zellen, sowie die Konzentration des Proteins im Kulturmedium bei unterschiedlicher "Chase"-Dauer gemessen. Die Daten sind in den Tabellen 3 und 4 für Fibroblasten mit normalem (N) und dilatiertem rER (D) aufgeführt. Die maximalen Konzentrationen an intrazellulärem, TCA-fällbarem ^{3}H-Protein schwankten bei den einzelnen Versuchen sowohl bei den Zellen mit normalem rER als auch bei den Fibroblasten mit dilatiertem rER. Sie waren aber ge-

nerell bei den Zellen mit dilatiertem rER gegenüber den Kontrollzellen während der gesamten "Chase"-Dauer teilweise sogar bis zu 80 % vermindert. Die maximalen ^{3}H-Protein-Konzentrationen im Medium waren mit einer Ausnahme bei den Fibroblasten mit dilatiertem rER gegenüber den Kontrollzellen ebenfalls vermindert, hier jedoch nur bis zu 50 %.

Im zeitlichen Verlauf der Proteinsynthese zeigten sich zwischen Fibroblasten mit normalem und dilatiertem rER deutliche Unterschiede. An einem Beispiel (Versuch 4) ist der zeitliche Verlauf der ^{3}H-Protein-Synthese und die Sekretion von neusynthetisiertem ^{3}H-Protein ins Kulturmedium dargestellt (Abb. 24 a, b).

So war intrazellulär die maximale Proteinkonzentration bei den Zellen mit normalem rER mit einer Ausnahme nach spätestens einer Stunde erreicht, während sie bei den Fibroblasten mit dilatiertem rER meist erst nach 2 Stunden vorlag.

Die Konzentration an TCA-fällbarem ^{3}H-Protein im Medium hatte bei den Fibroblasten mit normalem rER in allen Versuchen zwischen 30 Minuten und 1 Stunde ihren stärksten Anstieg; das Maximum war hier nach etwa 2 Stunden erreicht. Die Sekretion von ^{3}H-Protein ins Kulturmedium war dagegen bei den Zellen mit dilatiertem rER in allen Versuchen deutlich verzögert. Die ^{3}H-Protein-Konzentration hatte hier ihren steilsten Anstieg zwischen 1-2 Stunden und erreichte erst nach 5-10 Stunden ihr Maximum.

Die Frage, an welchen Orten in der Zelle Verzögerungen in der Proteinsynthese oder im intrazellulären Transport von Zwischenprodukten zu lokalisieren sind, wurde durch die autoradiographischen Untersuchungen geklärt.

III.3. Quantitative elektronenmikroskopische Autoradiographie

Parallel zu den biochemischen Untersuchungen wurden zwei elektronenmikroskopische Autoradiographien quantitativ analysiert. Sie zeigen sowohl gut übereinstimmende Ergebnisse bei den Kontrollzellen, als auch die gleichen abweichenden Verhältnisse bei den Zellen mit dilatiertem rER.

Die Daten der quantitativen Analyse der Autoradiographien für die Chase-Zeiten 15, 30, 60 und 120 Minuten können den Tabellen 5-20 entnommen werden. Der Verdeutlichung dieser Ergebnisse dienen die Abb. 33 und 34, in denen die relativen spezifischen Aktivitäten der Zellkompartimente rER, Golgi-Apparat (GO) und peripheres Cytoplasma (PP) im zeitlichen Verlauf dargestellt sind, sowie die Abb. 35 und 36, die den prozentualen Anteil der Silberkörner für die einzelnen Kompartimente in bezug auf die Gesamtkornzahl pro Zelle mit seiner zeitlichen Kinetik zeigen.

Bereits nach *15 Minuten* zeigten sich erste Unterschiede zwischen den Zellen mit dilatiertem rER und den Kontrollzellen in der Verteilung der Radioaktivität in der Zelle (Tab. 5, 6, 13, 14). So war bei den Kontrollzellen bereits zu diesem Zeitpunkt eine vermehrte Silberkornansammlung sowohl im Golgi-Apparat, als auch im rER zu verzeichnen (Abb. 25, 33-36), während sich in den Zellen mit erweitertem rER noch der Hauptanteil des radioaktiven Materials im rER befand (Abb. 26, 33-36).

Dieser Unterschied verstärkte sich noch nach *30 Minuten* (Tab. 7, 8, 15, 16). Bei den Zellen

mit normalem rER erfolgte eine Akkumulation von Silberkörnern im Golgi-Apparat (Abb. 27, 33-36), während im rER keine erhöhte Aktivität mehr zu verzeichnen war. Dagegen hatte bei den Zellen mit dilatiertem rER zu diesem Zeitpunkt das rER noch immer die größte relative spezifische Aktivität, wobei im Golgi-Apparat noch kein nennenswerter Aktivitätsanstieg zu verzeichnen war (Abb. 28, 33-36).

Die Werte für die relative spezifische Aktivität im peripheren Cytoplasma der Kontrollzellen lagen zwar zu diesem Zeitpunkt schon etwas über 1 und damit höher als bei den Zellen mit geblähtem rER, von einer deutlichen Konzentration radioaktiven Materials kann aber hier noch nicht gesprochen werden (Abb. 33, 34).

Nach *60 Minuten* (Tab. 9, 10, 17, 18) war bei den Zellen mit normalem rER bereits die vermehrte Aktivität im Golgi-Apparat wieder deutlich abgefallen, wobei parallel dazu im peripheren Cytoplasma mit Zellmembran und assoziiertem Fasermaterial ein Anstieg der Aktivität zu verzeichnen war (Abb. 29, 33-36). Dagegen fand man erst jetzt eine deutliche Abnahme des radioaktiven Materials im erweiterten rER der Fibroblasten: die Werte für die relative spezifische Aktivität sanken unter 1, d.h. es lag keine vermehrte Ansammlung von Aktivität mehr im dilatierten rER vor (Abb. 33, 34). Gleichzeitig stieg die Aktivität im Golgi-Apparat deutlich an (Abb. 30, 33-36).

Die vermehrten Silberkornansammlungen im peripheren Zellbereich hielten bei den Kontrollzellen auch nach *120 Minuten* noch an (Abb. 31, 33-36). Erst zu diesem Zeitpunkt war auch bei den Zellen mit dilatiertem rER ein Anstieg der Aktivität im peri-

pheren Cytoplasma zu beobachten (Abb. 32-36), verbunden nun auch hier mit einer Abnahme der Aktivität im Golgi-Apparat. Die relative spezifische Aktivität im rER war in beiden Zelltypen zu diesem Zeitpunkt nicht erhöht (Tab. 11, 12, 19, 20).

Im Grundcytoplasma, Kern und Mitochondrien war die relative spezifische Aktivität sowohl bei den Zellen mit normalem rER als auch bei den Zellen mit dilatiertem rER über den gesamten gemessenen Zeitverlauf unverändert niedrig (Tab. 5-20).

Die Tabellen 1 a und b enthalten die relativen Flächenanteile der einzelnen Zellkompartimente an der Gesamtzellfläche. Die einzelnen Werte ergeben sich aus dem Verhältnis der HR-Kreise, die in 5 Zellen auf ein bestimmtes Kompartiment entfallen, zur Gesamtzahl der HR-Kreise über diesen 5 Zellen.

Das normale rER hatte einen relativen Flächenanteil von etwa 8 %, während das erweiterte rER incl. Lumen etwa 20 % des Zellquerschnittes einnahm.

Auch beim Golgi-Apparat war in den Zellen mit dilatiertem rER ein geringfügig erhöhter relativer Flächenanteil von 5 % gegenüber 3 % bei den Kontrollzellen zu beobachten.

Entsprechend dem höheren Flächenanteil von rER und Golgi-Apparat (insgesamt um 14 % erhöht) bei den Zellen mit dilatiertem rER lag der Flächenanteil des Grundcytoplasmas am Gesamtzellquerschnitt um etwa 15 % niedriger als bei den Kontrollzellen.

Die relativen Flächenanteile der übrigen Zellkompartimente peripheres Cytoplasma, Mitochondrien und Kern waren bei beiden Zellansätzen etwa gleich hoch.

IV. Diskussion

IV.1. Methodische Überlegungen

Collagen wird von menschlichen Hautfibroblasten in Zellkultur nach Gay et al. (1976) und nach Rowe et al. (1978) zu etwa 5-10 % des Gesamtproteins synthetisiert, nach Freiberger et al. (1980) sind es 14 % und nach Booth et al. (1980) sogar 20-25 %. In Untersuchungen zur Collagensynthese wird vorwiegend ^{3}H-Prolin als Traceraminosäure verwendet (Lowther et al., 1961; Israel et al., 1968; Salpeter, 1968; Comstock et al., 1969; Dehm, Prockop, 1971; Harwood et al., 1976). Das ergibt sich aus der Struktur und der Aminosäurezusammensetzung des Collagenmoleküls (Prockop et al., 1979): Das Molekül besitzt die Struktur einer Triplehelix aus 3 Polypeptid-Ketten, den α-Ketten. Jede α-Kette enthält etwa 1000 Aminosäuren, wobei Glycin in jeder 3. Position steht nach dem Schema $(X\text{-}Y\text{-}Gly)_{333}$. Etwa 100mal befindet sich Prolin in X-Position und etwa 100mal Hydroxyprolin in Y-Position. Die übrigen X- und Y-Positionen sind mit anderen Aminosäuren besetzt. Dabei hängt die Stabilität der Helix offenbar vom Hydroxylierungsgrad des Prolins ab (Jimenez, Jankowski, 1975; Prockop et al., 1979).

Bei der Prolin- und Lysinhydroxylierung wirkt Ascorbinsäure als Cofaktor der Enzyme Prolylhydroxylase und Lysylhydroxylase (Stone, Meister, 1962; Berg et al., 1976), wobei ein Mangel an Ascorbinsäure zur Synthese defekter Collagenmoleküle führt (Pinnell, 1986). In morphologischen Untersuchungen wurde ein Ascorbinsäureeinfluß auch auf die rER-Struktur beschrieben (Schafer et al., 1967).

Da nun in der vorliegenden Untersuchung die Zusammenhänge zwischen einer Störung im Verlauf der Collagensynthese und einem dilatierten rER untersucht werden sollten, war hier die Aminosäure ^{3}H-Prolin ein geeigneter Tracer für die radioaktive Markierung.

Prolin ist allerdings nicht spezifisch für Collagen, d.h. es wird nach Pinnell (1985) zu 70-80 % in Collagen incorporiert, nach Sodek (1977) sogar zu etwa 90 % und zu etwa 10 % in andere Proteine wie z.B. Fibronectin (Dehm, Prockop, 1971). Das bedeutet, daß der Weg, den ^{3}H-Prolin durch die Zelle nimmt, zwar vorwiegend der des Collagens, aber auch der anderer sekretorischer Proteine und Strukturproteine ist.

Um den zeitlichen Ablauf der Proteinsynthese und den Transport neu synthetisierter Proteine intrazellulär lokalisieren zu können, könnte nach Subfraktionierung der Fibroblasten der Tracer biochemisch in den einzelnen Organellen nachgewiesen werden. Für Collagen liegen Untersuchungen von Lowther et al. (1961), Harwood et al. (1976), Guzman et al. (1976) und Uchida et al. (1980) vor. Überschneidungen in der Dichteverteilung der einzelnen subzellulären Fraktionen kann allerdings zu Fehlinterpretationen bei der Zuordnung der gemessenen Aktivitäten zu einzelnen Zellorganellen führen.

Eine weitere Möglichkeit bietet die in der vorliegenden Untersuchung angewandte Methode der quantitativen elektronenmikroskopischen Autoradiographie, bei der nach Markierung mit einem radioaktiven Tracer die Verteilung der Radioaktivität über Zellquerschnitten durch Silberkornzählungen über einzelnen Zellkompartimenten dargestellt wird. Darüber hinaus kann durch die Verwendung eines re-

gelmäßigen HR-Kreise-Rasters (s.S. 21) der relative Flächenanteil der Kompartimente an der Gesamtzellfläche mit in die Analyse einbezogen werden (Ross, Benditt, 1965). Bei der in der vorliegenden autoradiographischen Auswertung angewandten "circle method" wurde außerdem die autoradiographische Auflösung berücksichtigt, indem eine Zuordnung von Silberkörnern zu Zellkompartimenten in einem 50 %-Wahrscheinlichkeitskreis erfolgte (Williams, 1977).

Um die Passage der radioaktiven Substanz durch die Zelle räumlich und zeitlich zu verfolgen, erfolgt die radioaktive Markierung in einem möglichst kurzen "Pulse", so daß die Translokation der Aktivität von einem Kompartiment zum anderen über fortlaufende "Chase"-Zeiten untersucht werden kann (Ross, Benditt, 1965; Weinstock, Leblond, 1974; Habener et al., 1979; Cho, Garant, 1981; Marchi, Leblond, 1983; Marchi, Leblond, 1984).

Dabei kann die Wegrichtung nicht in allen Fällen eindeutig zugeordnet werden. Dem Kompartiment "peripheres Cytoplasma" (PP), welches im Syntheseverlauf zweimal von radioaktiven Substanzen passiert wird, wurden alle diejenigen Silberkörner zugeordnet, die im Bereich von Vesikeln und Mikrofilamenten im peripheren Zellbereich und auf der Zellmembran zu lokalisieren waren, unabhängig davon, ob diese Substanzen gerade in die Zelle aufgenommen oder aus der Zelle ausgeschleust wurden. Aus der zeitlichen Abfolge der Collagen-Syntheseschritte lassen sich aber die relativ hohen prozentualen Silberkornanteile bereits nach 15 und 30 Minuten "Chase" (Abb. 35, 36) eher auf radioaktive Substanzen zurückführen, die gerade den peripheren Zellbereich in Richtung rER passieren, während

die steigenden prozentualen Silberkornanteile bei den "Chase"-Zeiten 120 Minuten und bei Fibroblasten mit normalem rER auch bereits nach 60 Minuten auf Collagenprecursor hindeuten, die nach Verlassen des Golgi-Apparates durch den peripheren Zellbereich ausgeschleust werden.

Bei Vergleichen zwischen den Ergebnissen der biochemischen und der autoradiographischen Untersuchungen müssen die unterschiedlichen analytischen Möglichkeiten der beiden Methoden in Betracht gezogen werden. So wird biochemisch die TCA-fällbare Radioaktivität in den Zellen sowie im Medium gemessen. Die so in den Zellen erfaßten Proteinkonzentrationen entsprechen in etwa den aldehyd-fixierbaren ^{3}H-Proteinen, die in der autoradiographischen Analyse registriert werden.

Zusätzlich können aber nach Peters und Ashley (1967) durch die Aldehydgruppen im Glutaraldehyd auch freie Aminosäuren an Zellproteine gebunden werden. Diese unspezifische Bindung des ^{3}H-Prolins liegt bei nicht gewaschenen Geweben unter 8 %. In der vorliegenden Präparation wurden die Zellmonolayer jedoch 6 mal gewaschen, so daß die unspezifische Bindung geringer sein muß. Sie könnte durch Fixierung mit Paraformaldehyd weiter vermindert werden (Cho, Garant, 1981). Dennoch wurde hier zugunsten besserer morphologischer Resultate hinsichtlich der Analyse der Autoradiogramme die übliche Aldehydfixierung vorgezogen.

Auf Grund der unterschiedlichen Empfindlichkeit der biochemischen und der autoradiographischen Meßmethoden lassen sich Korrelationen zwischen Counts und Silberkornanzahl nicht direkt herstellen. So werden mit dem β-Counter radioaktive Zerfälle integral über Zellpopulationen jeweils 10

Minuten lang bei etwa 30 %iger Ausbeute gemessen. Die Ergebnisse werden in Counts/Minute angegeben und auf 100.000 Zellen normiert.

Bei der autoradiographischen Analyse werden einzelne Zellquerschnitte ausgewertet, wobei noch zwischen einzelnen Zellorganellen differenziert werden kann. Die Expositionszeit, d.h. der Zeitraum, in dem radioaktive Zerfälle gemessen wurden, betrug in der vorliegenden Untersuchung 6 Wochen. Dabei beträgt die Silberkornausbeute in Abhängigkeit von der Energie des Strahlers, der Probengeometrie, der Emulsion und des Entwicklungsprozesses unter den vorliegenden Bedingungen 10 % der im Präparat stattgefundenen Zerfälle (Bachmann, Salpeter, 1967; Neumann, 1969).

IV.2. Morphologische Veränderungen des rER

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Feinstruktur von Fibroblasten in vivo (Movat, Fernando, 1962) und in vitro (Comings, Okada, 1970; Lie et al., 1973; Perdue, 1973; Lucky et al., 1975; Hedman et al., 1979; Singer, 1979) sind in den vergangenen Jahren mehrfach durchgeführt worden. Die dort beschriebenen morphologischen Beobachtungen am normalen Fibroblasten in vivo und in vitro stimmen weitgehend mit den vorliegenden In-vitro-Befunden überein.

Die Erweiterung des rER in der vorliegenden Untersuchung zeigt die gleiche strukturelle Beschaffenheit wie bisher beschriebene Veränderungen des rER, die in vivo in Fibroblasten verschiedener Herkunft wie auch in arteriellen glatten Muskelzellen bei arteriosklerotischen Kaninchen (Parker, Odland, 1968) gefunden wurden. Ross und Benditt (1961, 1962) untersuchten die Collagensynthese bei der Wundheilung und fanden ein "abgerundetes rER" in Fibroblasten von skorbutischen Meerschweinchen. Schwarz et al. (1962) beschrieben häufig auftretende, starke Aufblähungen in Fibroblasten aus Hühnerembryonen, wohingegen bei Kulturfibroblasten immer ein englumiges rER auftrat. Sie interpretierten die verschiedenen Formen des rER bei Fibroblasten als "ungleiche Füllungszustände des Hohlraumsystems", wobei qualitativ verschiedene Funktionen des rER in beiden Fibroblastenformen ausgeschlossen wurden. Ähnliche Erweiterungen des rER traten in galactosebehandelten Fibroblasten von Patienten mit Galactosämie auf (Miller et al., 1968).

Die gleichen morphologischen Veränderungen wurden auch bei Untersuchungen an Fibroblasten *in vitro* beschrieben. So zeigten menschliche Hautfibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen von familiärer Hyperlipoproteinämie Vergrößerungen des rER-Flächenanteils von 10-15 % bei den Normalfibroblasten auf 20-30 % bei den pathologischen Formen (Maug, 1981). Diese Befunde decken sich gut mit den Messungen der vorliegenden Untersuchung, die eine Vergrößerung des rER-Flächenanteils - sowohl der Membranfläche als auch des Lumens - von 8 % auf 20 % ergaben. Damit scheint die Grenze der rER-Vergrößerungen erreicht. Eine stärkere Dilatation ist nicht beobachtet worden.

In weiteren Untersuchungen wurden verschiedene experimentelle Bedingungen beschrieben, die zu Erweiterungen des rER in normalen Fibroblasten führen können: Eintritt ins konfluente Stadium der Zellkultur (Comings, Okada, 1970), länger andauernde Kultur der Fibroblasten (Lucky et al., 1975) und Ascorbinsäuremangel, d.h. Ascorbinsäurekonzentrationen unter 1 µg/ml Medium = $5{,}68 \times 10^{-6}$ M (Schafer et al., 1967). Comings und Okada (1970) stellten dagegen den Einfluß eines Ascorbinsäuremangels auf die rER-Veränderungen noch in Frage.

Die in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen rER-Erweiterungen treten eindeutig auf bei hoher Zelldichte und Serummangelsituationen (1 % NS). Bei Serumkonzentrationen von 1 % NS liegt die Ascorbinsäurekonzentration unter 1 µg/ml Medium (Ascorbinsäurekonzentration im Serum von Normalpersonen: 6-12 µg/ml), was nach Schafer et al. (1967) zu einer Dilatation des rER führt. Für einen zusätzlichen Einfluß niedriger Serumkonzentration auf das rER, unabhängig von der

Ascorbinsäurekonzentration, gibt es nach den bisher vorliegenden Ergebnissen keine Anhaltspunkte. Eigene, hier nicht dokumentierte Untersuchungen, nach denen unter Zugabe von 50 µg Ascorbinsäure/ml Medium auch bei 1 % NS eine normale rER-Form vorliegt, bedürfen noch der weiteren Überprüfung.

Eine noch weitergehende Reduktion des Serumgehaltes im Kulturmedium auf 0,5 % führte bei CF-3-Fibroblasten nach 3 Tagen zu einer "Reduktion der Anzahl von rER-Cisternen" (Douglas et al., 1976). Hier liegt offenbar eine generelle Reduktion des Stoffwechsels vor, da auch ein Cristae-Verlust in den Mitochondrien, verbunden mit einer Reduktion der Cytochrom-Oxidase-Aktivität beschrieben wird. Die Ursache hierfür kann darin liegen, daß bei einem Serumgehalt von nur 0,5 % der Grenzwert zur Aufrechterhaltung eines Minimalstoffwechsels erreicht ist.

Die vorliegenden Untersuchungen über die rER-Veränderungen in ihrem zeitlichen Verlauf haben ergeben, daß auch unter optimaler Serumkonzentration (10 % NS) mit zunehmender Zelldichte die beschriebenen rER-Erweiterungen auftreten.

Wahrscheinlich sind diese Dilatationen des rER auf einen zunehmenden Mangel an Ascorbinsäure zurückzuführen, der sich durch die wachsende Zelldichte einstellt. Bei 10 %igem Serumgehalt des Mediums liegt die Ascorbinsäurekonzentration bei etwa 0,6-1,2 µg/ml und damit in der Nähe des von Schafer et al. (1967) angegebenen Grenzwertes.

Nach Untersuchungen von Peterkofsky (1972) zerfällt Ascorbinsäure im Kulturmedium bei 37 ^{o}C innerhalb von 24 Stunden bis auf etwa 2 % der Ausgangskonzentration. Daher traten in der vorliegenden Untersuchung die rER-Erweiterungen bei

Ascorbinsäurezugaben nicht auf. Darüber hinaus waren diese bei langer Kulturdauer aufgetretenen rER-Dilatationen reversibel und konnten durch Zugabe von 50 µg Ascorbinsäure/ml Medium rückgängig gemacht werden. Das bestätigt auch frühere Befunde, daß Ascorbinsäure in ausreichender Konzentration im Kulturmedium eine Erweiterung des rER zu verhindern oder rückgängig zu machen vermag (Schafer et al., 1967).

IV.3. Verlauf der Proteinsynthese in Fibroblasten mit normalem rER

Die Kenntnisse über die Struktur und die Biosynthese von Proteinen (Green, Goldberg, 1964; Palade, 1975) wie Fibronectin (Dufour et al., 1986) und speziell Collagen in Fibroblasten (Goldberg et al., 1972; Bornstein, 1974, 1980; Fessler, Fessler, 1978) wurden in den letzten Jahren durch eingehende biochemische und autoradiographische Untersuchungen immer mehr vervollständigt.

Die wichtigsten biochemischen Schritte im Verlauf der Collagensynthese (Bornstein, 1974; Grant, Jackson, 1976; Prockop et al., 1979; Prockop, 1984) sind in Tafel 2 dargestellt.

Tafel 2: Verlauf der Collagensynthese

intrazellulär	1. Transcription 2. Translation 3. Post-translationale Modifikationen - Abspaltung hydrophober Signalsequenzen - Hydroxylierung der Prolyl- und Lysylreste - Glycosylierung der Hydroxylysylreste - Disulfidbrückenbildung der endständigen Propeptide - Faltung dreier Pro-α-Ketten in Triple-helix-Konformation (→ "Procollagen")
extrazellulär	- enzymatische Abspaltung der Amino- und Carboxypropeptide (→ "Collagen") - Faserbildung durch Assoziation der Collagenmoleküle - "Cross-linking" der Collagenfasern durch kovalente Brücken

Welchen Weg dabei die Zwischenprodukte der Collagensynthese durch die Zelle beschreiten, war lange Zeit kontrovers:

Chapman beschrieb 1961 filamentöses Material in Fibroblasten in vivo, welches parallel und in enger Verbindung zur Zelloberfläche orientiert ist. Er vermutete collagenartiges Material, welches nach Synthese im rER durch Auflösen der Cytoplasmamembran in den Extrazellulärraum entlassen wird. Karrer (1960), Schwarz (1960), Merker (1961) und Sheldon (1961) diskutierten wiederum eine Ausschleusung von Collagenmaterial durch Öffnung der Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums nach außen. Karrer wies darüberhinaus auch extrazellulär gelegene Vesikel nach, die als ausgestoßene Fragmente des endoplasmatischen Retikulums interpretiert wurden. Im Gegensatz zu Chapman konnte jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden, daß eine Ausschleusung von fibrillärem Material durch Fragmentierung der Cytoplasmamembran erfolgt.

Autoradiographische Untersuchungen von Ross und Benditt (1965) an Fibroblasten und von Salpeter (1968) an Chondrozyten ließen noch vermuten, daß ein Teil des neu synthetisierten Procollagens direkt vom rER - ohne Passage des Golgi-Apparats - in den Extrazellulärraum ausgeschleust wird.

Dagegen konnte in Übereinstimmung mit bisherigen autoradiographischen Untersuchungen zur Biosynthese von Collagen (Revel, Hay, 1963; Weinstock, Leblond, 1974; Cho, Garant, 1981) die Passage der Collagenprecursoren durch die Zelle eindeutig festgelegt werden. Der Ablauf ist analog dem anderer sekretorischer Proteine (Jamieson, Palade, 1967): Nach der Aufnahme von ^{3}H-Aminosäuren in die Zelle sind ^{3}H-Proteine im rER nachweisbar.

Von dort findet eine Translokation in den Golgi-Apparat statt, von wo sie über den peripheren Zellbereich zur Zelloberfläche und in den Extrazellulärbereich gelangen.

Autoradiographische In-vivo-Untersuchungen von Marchi und Leblond (1984) zur Collagensynthese von Fibroblasten bei Ratten ergaben detailliertere Ergebnisse in bezug auf die rER-Golgi-Passage von Collagen-Precursoren. Demnach verlassen diese das rER via tubulärer und vesikulärer Zwischenelemente, passieren erst sphärische, dann zylindrische Ausstülpungen des Golgi-Apparates, um dann über sekretorische Vesikel in den Extrazellulärraum entlassen zu werden, wo schließlich die Collagen-Faserbildung erfolgt (Marchi, Leblond, 1983).

Nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit können in anderen Zellkompartimenten, die noch in der quantitativen Analyse der Autoradiographien mit einbezogen waren, nämlich Kern, Mitochondrien und Grundcytoplasma, keine neu synthetisierten Proteine lokalisiert werden, da dort zu keinem Zeitpunkt eine Akkumulation radioaktiven Materials vorlag.

Der in der vorliegenden autoradiographischen Untersuchung beobachtete zeitliche Ablauf der Proteinsynthese in den Zellen mit normalem rER - nach 15 Minuten erhöhte Radioaktivität noch im rER, nach 30 Minuten maximale Radioaktivität im Golgi-Apparat, nach 60 Minuten im peripheren Cytoplasma (s. Abb. 35 a, 36 a) - stimmt im wesentlichen mit den Ergebnissen anderer autoradiographischer Arbeiten überein (Cho, Garant, 1981; Marchi, Leblond, 1984). Vergleichbar ist auch der zeitliche Verlauf in anderen synthetisch aktiven Zellen, wie Odontoblasten (Weinstock, Leblond, 1974), Knorpelzellen (Revel, Hay, 1963) und in Pankreasdrüsenzellen

(Amsterdam, Jamieson, 1974). Ein langsamerer Ablauf der Sekretion wurde dagegen in Drüsenzellen der Hypophysen von Ratten festgestellt (Salpeter, Farquhar, 1981). Ein Vergleich des zeitlichen Ablaufs der Proteinsynthese in verschiedenen Zelltypen ist in einer Übersicht in Tafel 3 dargestellt.

Tafel 3: Zeitlicher Verlauf der Proteinsynthese nach verschiedenen Autoren. Angegeben sind die Zeiten (in Minuten) nach Markierung mit radioaktiven Aminosäuren, nach denen die maximalen Radioaktivitäten in den einzelnen Zellkompartimenten vorlagen.

Revel, Hay (1963) *Knorpelzellen*	Amsterdam, Jamieson (1974) *Pankreasdrüsenzellen*	Weinstock, Leblond (1974) *Odontoblasten*	Salpeter, Farquhar (1981) *Hypophysendrüsenzellen*	Cho, Garant (1981) *Fibroblasten*	Marchi, Leblond (1984) *Fibroblasten*	Niechoj *Fibroblasten*	
10-15	10	2	30	3	4	bis 15	rER
		10			20		cis-Seite Golgi
30	10		60	10-20		30	
		20			40-60		trans-Seite Golgi
	70	20-30	120	30	60		Sekretions-Vesikel
						60	peripheres Cytoplasma
60-120		ab 90		ab 30			extrazellulär

Der autoradiographisch gemessene zeitliche Ablauf der ^{3}H-Protein-Passage durch die Zelle deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden biochemischen Untersuchung, bei denen die maximale Sekretion an synthetisiertem ^{3}H-Protein im Medium nach ein bis zwei Stunden erreicht war. Der gleiche Zeitraum wurde für die Collagensynthese bis zur Procollagensekretion ins Medium auch in biochemischen Untersuchungen von Goldberg und Sherr (1973), sowie von Kruse und Bornstein (1975) ermittelt.

Nach der vorliegenden biochemischen Untersuchung wurde offenbar nicht das gesamte neu synthetisierte ^{3}H-Prolin von den Fibroblasten sezerniert, sondern es verblieben 20-40 % des intrazellulär maximal gemessenen ^{3}H-Proteins während der ganzen Chase-Dauer von 24 Stunden in den Zellen. Nach autoradiographischen Untersuchungen von Salpeter und Farquhar (1981) an Hypophysen von Ratten verblieben ebenfalls ca. 30 % des incorporierten radioaktiven Materials während der gesamten Versuchsdauer (4 Stunden) im Grundcytoplasma. Ein Anteil könnte als Strukturprotein intrazellulär eingebaut worden sein, da insbesondere der Zellkern prolinreiche Strukturproteine enthält (Revel, Hay, 1963). Hinweise darauf gibt es jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht, da in der autoradiographischen Analyse im Chase-Verlauf keine Erhöhung der prozentualen oder relativen Silberkornanteile im Cytoplasma und im Kern zu verzeichnen war.

Möglicherweise bleibt ein Teil des sezernierten ^{3}H-Proteins mit der Zelloberfläche assoziiert und kann nicht durch Waschen entfernt werden. Dabei könnte es sich entweder um extrazellulär in der Matrix abgelagertes Collagen handeln, welches nach Dehm und Prockop (1971) häufig zu

einem großen Teil fälschlicherweise dem Zellmonolayer zugeordnet wird; oder es handelt sich um Fibronektine, die an Plasmamembran-ständige Rezeptoren binden und mit den intrazellulär assoziierten Mikrofilamenten den Fibronexus bilden (Singer, 1979; Dufour et al., 1986). Auch solche Verbindungen zwischen Cytoskelett, Plasmamembran und extrazellulärer Matrix (Horwitz et al., 1986) können biochemisch zu einer Fehleinschätzung von intra- und extrazellulären Proteinkonzentrationen führen.

Auf solche, in der Matrix abgelagerte, zellassoziierte ^{3}H-Proteine deuten Silberkörner, die im extrazellulären Fasermaterial nachgewiesen wurden (Abb. 29). Diese Silberkörner wurden aber auf Grund mangelnder Kompartimentierungsmöglichkeiten nicht in die autoradiographische Analyse einbezogen.

Der Gehalt an ^{3}H-Protein im Medium stieg nach den vorliegenden biochemischen Messungen nicht im gleichen Maße wie er in den Zellen abnahm. Geesin et al. (1985, 1986) stellten fest, daß in kultivierten menschlichen Hautfibroblasten ein Teil des neu synthetisierten Procollagens auch unter Normalbedingungen bereits intrazellulär wieder abgebaut wird. Dieser Abbau findet vermutlich im Lysosomensystem (Multivesicular Bodies, Dense Bodies) statt, wo Marchi und Leblond (1983) neu synthetisiertes Procollagen nachwiesen. Geesin et al. (1986) vermuteten darin eine Kontrollfunktion zur "Eliminierung qualitativ schlechter Moleküle". Die entsprechenden Enzyme Collagenase und Procollagen-Peptidase sind 1977 von Goldberg in menschlichen Hautfibroblastenkulturen entdeckt worden. Nach Bienkowsky et al. (1978) werden 20-40 % des neu synthetisierten Procollagens bereits nach wenigen Minuten intra-

zellulär wieder abgebaut. Dabei ist dieser intrazelluläre Procollagenabbau offenbar von der Wachstumsphase der Fibroblastenkulturen abhängig. So belegen Untersuchungen von Berg et al. (1980), daß Lungenfibroblasten im frühen logarithmischen Wachstumsstadium 30 % des neu synthetisierten Procollagens wieder abbauen, im konfluenten Stadium dagegen nur 10 %. Auf diesen intrazellulären Procollagenabbau hat Ascorbinsäure keinen Einfluß (Geesin et al., 1986; Pinnell, 1985).

Es liegen auch Untersuchungen von Jimenez und Yankowsky (1975) vor, nach denen unterhydroxyliertes Procollagen im Kulturmedium extrazellulär schnell wieder abgebaut wird, da es nur in der hydroxylierten Helixform stabil ist (Uitto, Prockop, 1974). Im vorliegenden Fall dürfte aber bei Ascorbinsäurezusatz der Anteil an nicht vollständig hydroxyliertem Procollagen niedrig sein.

IV.4. Verlauf der Proteinsynthese in Fibroblasten mit erweitertem rER

Autoradiographische Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Proteinsynthese und -sekretion in menschlichen Fibroblasten mit erweitertem rER lagen bisher noch nicht vor.

Die zeitliche Verzögerung im Verlauf der ^{3}H-Protein-Sekretion von Fibroblasten mit erweitertem rER, wie sie biochemisch belegt wurde (s. III.2), konnte durch die autoradiographischen Untersuchungen primär im rER lokalisiert werden. Dies ist besonders bemerkenswert, weil die Verzögerung in der intrazellulären Proteintranslokation im rER bei gleichzeitig biochemisch messbarer verminderter Proteinsynthese nachweisbar ist. Damit kann als wesentliches Korrelat eines erweiterten rER eine Störung in der Proteintranslokation belegt werden. Die Dilatation des rER ist nicht, wie Geer (1965) vermutete, Folge einer gesteigerten Stoffwechselaktivität.

Nelson et al. (1978), die autoradiographisch den Ablauf der Proteinsynthese in Cytotrophoblasten und syncytiellen Trophoblasten aus der menschlichen Placenta verglichen, fanden bei syncytiellen Trophoblasten mit einem erweiterten rER ebenfalls einen verzögerten Proteintransfer aus dem rER. Hier gibt es jedoch keinen Hinweis auf eine verminderte Proteinsynthese.

Veränderungen im Verlauf der Protein- und speziell der Collagensynthese bei Fibroblasten sind vielfach untersucht worden, insbesondere auch im Zusammenhang mit genetischen Defekten (Bailey et al., 1974; Müller et al., 1975; Krane, 1980; Peltonen

et al., 1980; Prockop, Kivirikko, 1984). Der normale Synthese-und Sekretionsweg des Collagens (Weinstock, 1972; Weinstock, Leblond, 1974; Bornstein, 1980; Bornstein et al., 1984) kann durch unterschiedliche Einflüsse an verschiedenen Syntheseschritten verändert sein.

So wird übereinstimmend eine stimulierende Wirkung der Ascorbinsäure auf die Hydroxyprolin- und Hydroxylysinbildung beschrieben (Kivirikko, Prockop, 1967; Hutton et al., 1967; Peterkofsky, Udenfriend, 1965; Bates et al., 1972; Blanck, Peterkofsky, 1975; Kao et al., 1975, 1977; Berg et al., 1976; Schwarz, Bissell, 1977; Russel et al., 1981; Geesin et al., 1986; Pinnell, 1986). Eine Zugabe von 40 µg Ascorbinsäure/ml Kulturmedium steigert die Hydroxyprolinsynthese auf das 2-fache, und zwar nach Untersuchungen von Kao et al. (1975) innerhalb von 30 Minuten und nach Angaben von Berg et al. (1976) und Booth et al. (1980) innerhalb von 4 Stunden. Umgekehrt führt ein Ascorbinsäuremangel zu einer verminderten Collagensynthese durch Hemmung der Hydroxyprolinbildung (Stone, Meister, 1962; Anttinen et al., 1973; Nolan, Cardinale, 1977 ; Prockop et al., 1979) und damit zur Akkumulation von vermindert ausschleusbarem, weil unterhydroxyliertem Procollagen (Prockop et al., 1979).

Dabei scheint der Ascorbinsäureeinfluß von der Wachstumsphase in der Zellkultur abzuhängen (Berg et al., 1976), d.h. die Empfindlichkeit der Fibroblasten auf einen Ascorbinsäuremangel ist in der stationären Phase am geringsten, was möglicherweise auf eine Synthese von ascorbinsäure-ersetzenden Substanzen zurückgeführt werden kann (Peterkofsky, 1972). Diese Abhängigkeit von der Wachstumsphase kann aber auch auf eine steigende Aktivität der Prolylhydroxylase im Verlauf der log-Phase zurück-

zuführen sein (Comstock et al., 1970). Nach neueren Untersuchungen hat die Zelldichte in den Fibroblastenkulturen jedoch keinen Einfluß auf den Ascorbinsäureeffekt (Pinnell, 1986).

Bei optimaler Ascorbinsäurekonzentration ist die Procollagensynthese abhängig von der Serumkonzentration im Kulturmedium. Nach Freiberger et al. (1980) ist sie optimal bei Serumkonzentrationen um 10 % FCS, nach Booth et al. (1980) dagegen bei Serumkonzentrationen zwischen 10 und 30 % FCS. Pinnell (1985) führte dagegen Versuche zur Collagensynthese bei einem Serumgehalt von nur 0,5 % FCS durch, nachdem die Fibroblasten in 20 % FCS bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet worden waren.

Ein Einfluß der Wachstumsphase oder Zelldichte auf die Collagensynthese wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich bewertet. Nach Booth et al. (1980) ist die Procollagensynthese, gemessen an der Synthese von ^{3}H-Hydroxyprolin, am höchsten einen Tag nach Erreichen der Konfluenz. Sie ist dagegen, gemessen an der Konzentration Collagenase-spaltbarer ^{3}H-Peptide, am höchsten in der log-Phase der Zellvermehrung und nimmt anschließend ab. Nach Freiberger et al. (1980) hat die Zelldichte keinen spezifischen Einfluß auf die ^{3}H-Collagensynthese, dagegen sinkt die ^{3}H-Proteinsynthese insgesamt mit steigender Zelldichte.

Neben Ascorbinsäure haben noch andere Substanzen Einfluß auf das Enzymsystem zur Prolylhydroxylierung, wie z.B. Sauerstoff (Cooper, Prockop, 1968), α-Ketoglutarsäure, Eisenionen und damit indirekt auch α,α'-dipyridyl als Chelatbildner für Eisen (Kivirikko, Prockop, 1967; Prockop, Cooper, 1966).

Tunicamycin führt zu Störungen in der Proteinsynthese in menschlichen Fibroblasten durch Hemmung der Glycosylierung von Procollagen und Fibronectin (Housley et al., 1980).

Ledger et al. beobachteten 1980 bei menschlichen Fibroblasten nach Inkubation mit dem Calciumionophor Monensin eine Akkumulation von Procollagen und Fibronectin in einem erweiterten rER und in Vesikeln im Bereich des Golgi-Apparates und interpretierten dies entweder als eine Blockade des Abtransportes von Proteinen aus dem rER oder als Kapazitätsüberschreitung im Golgi-Apparat, welches zu einem Rückstau bis ins rER führt. Tartakoff und Vassalli (1978) lokalisierten die Monensin-Wirkung als Blockade im Golgi-Apparat. Hier lag ebenfalls eine Protein-Translokations-Hemmung - durch den Ionophor Monensin - vor, dagegen konnte kein Einfluß auf die Proteinsynthese der Zellen nachgewiesen werden (Uchida et al., 1979, 1980).

In Gegenwart von Colchicin und Vinblastin kann Procollagen durch Störung der Mikrotubuli-Funktion nicht ausgeschleust werden und akkumuliert im Golgi-Apparat, was zu Erweiterungen der Golgi-Vesikel führt (Ehrlich et al., 1974; Dehm, Prockop, 1972; Ehrlich, Bornstein, 1972; Diegelmann, Peterkofsky, 1972), und zwar über einen Zeitraum bis zu 4 Stunden (Cho, Garant, 1981).

Diese bisherigen biochemischen Befunde einer Störung des Collagenstoffwechsels durch Ascorbinsäuremangel einerseits sowie die in morphologischen Untersuchungen beschriebenen, unter den gleichen Bedingungen auftretenden rER-Dilatationen in menschlichen Fibroblasten waren bisher noch nicht auf ihren Zusammenhang hin untersucht worden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann nun die Frage nach einer Korrelation zwischen einem erweiterten rER und einer Störung im Proteinstoffwechsel bei menschlichen Fibroblasten eindeutig beantwortet werden. Der hier vorliegende Defekt äußert sich in einer verlangsamten Translokation von neu synthetisierten ^{3}H-Proteinen durch die Zelle, verbunden mit ihrer verzögerten Abgabe ins Kulturmedium. Die Dilatation des rER ist Ausdruck einer verzögerten Proteintranslokation aus dem rER.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen einer Dilatation des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) bei menschlichen Fibroblasten und einer Störung im Proteinstoffwechsel dieser Zellen untersucht.

Solche rER-Dilatationen wurden bisher sowohl in vivo als auch in vitro in verschiedenen Zelltypen im Zusammenhang mit Stoffwechselerkrankungen beschrieben.

Diese rER-Vergrößerungen von etwa 8 % auf 20 % des Zellvolumens traten nach der vorliegenden Untersuchung in Zellkultur unter Ascorbinsäure-Defizienz auf, die bei andauernder Kultur konfluenter Fibroblasten oder bei niedriger Serumkonzentration (1 % Normalserum) vorlag. Die so induzierten rER-Vergrößerungen waren reversibel oder zu verhindern durch Inkubation in 10 % Normalserum und Zugabe von Ascorbinsäure (50 µg/ml).

Zur Klärung der vorliegenden Fragestellung wurden Fibroblasten mit normalem und dilatiertem rER in Zellkultur mit ^{3}H-Prolin in "Pulse-Chase"-Experimenten radioaktiv markiert. Biochemisch wurde die ^{3}H-Protein-Konzentration im zeitlichen Verlauf intrazellulär und im Medium bestimmt. Mittels elektronenmikroskopischer Autoradiographie konnten die biochemisch messbaren Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Proteinsynthese nach der "Circle method" von Williams (1977) quantifiziert und ultrastrukturell lokalisiert werden.

Dabei ergaben die biochemischen Untersuchungen bei den Fibroblasten mit erweitertem rER eine

verminderte ^{3}H-Protein-Synthese einschließlich verzögerter extrazellulärer Abgabe von ^{3}H-Protein. Morphologisch ließ sich diese zeitliche Verzögerung im Verlauf der Proteinsynthese und -sekretion innerhalb der Zelle lokalisieren. Demnach findet bei den Fibroblasten mit dilatiertem rER eine langsamere Translokation radioaktiv markierter Substanzen durch die Zellkompartimente statt. Diese Verzögerung wird daran erkennbar, daß das radioaktive Material in den Fibroblasten mit erweitertem rER anfangs im rER verbleibt, erst nach 60 Minuten im Golgi-Apparat nachweisbar ist und erst nach 120 Minuten im peripheren Cytoplasma. Im Gegensatz dazu erscheint es in Fibroblasten mit normalem rER nach Passage des rER bereits nach 30 Minuten im Golgi-Apparat und schon nach 60 Minuten im peripheren Cytoplasma. Damit hat die langsamere Proteintranslokation durch die Zelle ihren Ursprung in einem zeitlich verzögerten Abtransport von neu synthetisiertem ^{3}H-Protein aus dem rER.

Die Beantwortung der vorliegenden Fragestellung war von besonderer Bedeutung, da die beobachteten Veränderungen des rER in den verschiedensten mesenchymalen Zelltypen in vivo auftreten können, z.B. in den Zellen arteriosklerotisch veränderter Gefäßwände, wo bereits Störungen in der Proteinsynthese beschrieben wurden.

Diese Proteinstoffwechselstörungen könnten in der Arterienwand über längere Zeiten zu einer Akkumulation von Bindegewebsproteinen beitragen, da solche Veränderungen des rER und erhöhte Proteinablagerungen besonders bei alternden Zellen und auch in Zellen der arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand vermehrt beobachtet worden sind.

IV. Literaturverzeichnis

Amsterdam, A., Jamieson, J.D. — Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of seperated cells. J. Cell. Biol. 63, 1057-1073 (1974)

Anttinen, H., Orava, S., Ryhänen, L. — Assay of protocollagen lysyl hydroxylase activity in the skin of human subjects and changes in the activity with age. Clin. Chim. Acta 47, 289-294 (1973)

Bachmann, L., Salpeter, M.M. — Zur Autoradiographie im elektronenmikroskopischen Bereich. Die Naturwiss. 10, 237-238 (1964)

Bachmann, L., Salpeter, M.M. — A quantitative approach to high resolution autoradiography. Third reg. Eur. Conf. on El. Microsc., Prag 1964

Bachmann, L., Salpeter, M.M. — Autoradiography with the electron microscope. A quantitative evaluation. Lab. Invest. 14, 303-315 (1965)

Bachmann, L., Salpeter, M.M. — Absolute sensitivity of electron microscope autoradiography. J. Cell. Biol. 33, 299-305 (1967)

Bachmann, L., Salpeter, M.M.
Electron microscope autoradiography.
Meth. Elmi. 5, 1-28 (1973)

Bachmann, L., Salpeter, M.M., Salpeter, E.E.
Das Auflösungsvermögen elektronenmikroskopischer Autoradiographien.
Histochemie 15, 234-250 (1968)

Backwinkel, K.P., Schmitt, G., Themann, H., Hauss, W.H.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Frühveränderungen der Koronararterien bei experimenteller Hypertonie.
Beitr. Path. Bd. 141, 374-391 (1970)

Bailey, A.J., Robins, S.P., Balian, G.
Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen.
Nature 251, 105-109 (1974)

Bates, C.J., Prynne, C.J., Levene, C.I.
The synthesis of underhydroxylated collagen by 3T6 mouse fibroblasts in culture.
Biochim. Biophys. Acta 263, 397-405 (1972)

Berg, R.A., Kao, W.W.-Y., Prockop, D.J.
Prolyl hydroxylase activity in L-929 fibroblasts incubated with and without ascorbate.
Biochim. Biophys. Acta 444, 756-764 (1976)

Berg, R.A., Schwartz, M.L., Crystal, R.G.
Regulation of the production of secretory proteins: Intracellular degradation of newly synthesized "defective" collagen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4746-4750 (1980)

Bienkowski, R.S., Cowan, M.J., McDonald, J.A., Crystal, R.G.
Degradation of newly synthesized collagen.
J. Biol. Chem. 253, 4356-4363 (1978)

Blackett, N.M., Parry, D.M.
A new method for analyzing electron microscope autoradiographs using hypothetical grain distributions.
J. Cell. Biol. 57, 9-15 (1973)

Blanck, T.J., Peterkofsky, B.
The stimulation of collagen secretion by ascorbate as a result of increased proline hydroxylation in chick embryo fibroblasts.
Arch. Biochem. Biophys. 171, 259-267 (1975)

Booth, B.A., Polak, K.L., Uitto, J.
Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts.
I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens.
Biochim. Biophys. Acta 607, 145-160 (1980)

Bornstein, P.
The biosynthesis of collagen.
Annu. Rev. Biochem. 43, 567-603 (1974)

Bornstein, P.
The biosynthesis, secretion and processing of procollagen.
In: Biology of Collagen
ed. A. Viidik, J. Vuust, Acad. Press, London (1980)

Bornstein, P., Hörlein, D., McPerson, J.
Regulation of collagen synthesis. In: Myelofibrosis and the Biology of Connective Tissue, 61-80 Alan Liss Inc., New York (1984)

Caro, L.G., van Tubergen, R.P., Kolb, J.
High-resolution autoradiography. I. Methods J. Cell. Biol. 15, 173-188 (1962)

Chao, Y.-S., Jones, A.L., Hradek, G.T., Windler, E.E. Havel, R.J.
Autoradiographic localization of the sites of uptake, cellular transport and catabolism of low density lipoproteins in the liver of normal and estrogen-treated rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 597-601 (1981)

Chapman, J.A.
Morphological and chemical studies of collagen formation. I. Fine structure of guinea pig granulomata. J. biophys. biochem. Cytol. 9, 639-651 (1961)

Cho, M.I., Garant, P.R.
An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: I. Normal fibroblasts. Anat. Rec. 201, 577-586 (1981)

Cho, M.I., Garant, P.R.
An electron microscopic radioautographic study of collagen secretion in periodontal ligament fibroblasts of the mouse: II. Colchicin-treated fibroblasts. Anat. Rec. 201, 587-598 (1981)

Comings, D.E., Okada, T.A.
Electron microscopy of human fibroblasts in tissue culture during logarithmic and confluent stages of growth.
Exp. Cell. Res. 61, 295-301 (1970)

Comstock, J.P., Gribble, T.J., Udenfriend, S.
Collagen chain formation and peptidyl proline hydroxylation in monolayer tissue cultures of L-929 fibroblasts.
Arch. Biochem. Biophys. 129, 308-316 (1969)

Comstock, J.P., Gribble, T.J., Udenfriend, S.
Further study on the activation of collagen proline hydroxylase in cultures of L-929 fibroblasts.
Arch. Biochem. Biophys. 137, 115-121 (1970)

Cooper, G.W., Prockop, D.J.
Intracellular accumulation of procollagen and extrusion of collagen by embryonic cartilage cells.
J. Cell. Biol. 38, 523-537 (1968)

Dehm, P., Prockop, D.J.
Synthesis and extrusion of collagen by freshly isolated cells from chick embryo tendon.
Biochim. Biophys. Acta 240, 358 (1971)

Dehm, P., Prockop, D.J.
Time lag in the secretion of collagen by matrix-free tendon cells and inhibition of the secretory process by colchicine and vinblastine.
Biochim. Biophys. Acta 264, 375-382 (1972)

Diegelmann, R.F., Peterkofsky, B. Inhibition of collagen secretion from bone and cultured fibroblasts by microtubular disruptive drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 892-896 (1972)

Douglas, W.H., Wittle, W.L., Dell'Orco, R.T. Fine structural and cytochemical studies of human diploid fibroblasts arrested in an essentially nonmitotic state. In vitro 12, 74-82 (1976)

Dufour, S., Duband, J.-L., Thiéry, J.-P. Role of a major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis. Biol. Cell 58, 1-14 (1986)

Ehrlich, H.P., Bornstein, P. Microtubules in transcellular movement of procollagen. Nat. New. Biol. 238, 257-260 (1972)

Ehrlich, H.P., Ross, R., Bornstein, P. Effects of antimicrotubular agents on the secretion of collagen. J. Cell. Biol. 62, 390-405 (1974)

Fessler, J.H., Fessler, L.I. Biosynthesis of procollagen. Ann. Rev. Biochem. 47, 129-162 (1978)

Fischer, N., Staubesand, J. Zur Ultrastruktur kollagener Fibrillen in normalen und veränderten Blutgefäßen. Acta anat. 114, 125-145 (1982)

Fischer, G.M., Swain, M.L., Cherian, K.
Increased vascular collagen and elastin synthesis in experimental artheriosclerosis in the rabbit.
Atherosclerosis 35, 11-20 (1980)

Freiberger, H., Grove, D., Sivarajah, A., Pinnell, S.R.
Procollagen I synthesis in human skin fibroblasts: Effect of culture conditions on biosynthesis.
J. Invest. Derm. 75, 425-430 (1980)

Fuller, G.C., Matoney, A.L., Fisher, D.D., Fausto, N., Cardinale, G.J.
Increased collagen synthesis and the kinetic characteristics of prolyl hydroxylase in tissues of rabbits with experimental arteriosclerosis.
Atherosclerosis 24, 483-490 (1976)

Gay, S., Martin, G.R., Müller, P.K., Timpl, R., Kühn, K.
Simultaneous synthesis of types I and III collagen by fibroblasts in culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4037-4040 (1976)

Gazzola, G.C., Dall'Asta, V.D., Guidotti, G.G.
The transport of neutral amino acids in cultured human fibroblasts.
J. Biol. Chem. 255, 929-936 (1980)

Geesin, J., Murad, S., Pinnell, S.R.
Stimulated collagen production in human skin fibroblasts by ascorbic acid is unrelated to intracellular degradation.
J. Invest. Dermatol. 84, 296 (1985)

Geesin, J., Murad, S., Pinnell, S.R. — Ascorbic acid stimulates collagen production without altering intracellular degradation in cultured human skin fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 886, 272-274 (1986)

Geer, J.C. — Fine structure of canine experimental atherosclerosis. Amer. J. Path. 47, 241-269 (1965)

Goldberg, B. — Kinetics of processing of type I and type III procollagens in fibroblast cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3322-3325 (1977)

Goldberg, B., Epstein, E.H., Sherr, C,J. — Precursors of collagen secreted by cultured human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3655-3659 (1972)

Goldberg, B., Green, H. — An analysis of collagen secretion by established mouse fibroblast lines. J. Cell. Biol. 22, 227-258 (1964)

Goldberg, B., Sherr, C.J. — Secretion and extracellular processing of procollagen by cultured human fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 361-365 (1973)

Grant, M.E., Jackson, D.S. — The biosynthesis of procollagen. Essays biochem. 12, 77-113 (1976)

Green, H., Goldberg, B. — Kinetics of collagen synthesis by established mammalian cell lines. Nature 200, 1097-1098 (1963)

Green, H., Goldberg, B. — Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line. Nature 204, 347-349 (1964)

Guzman, N.A., Rojas, F.J., Cutroneo, K.R. — Collagen lysyl hydroxylation occurs within the cisternae of the rough endoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys. 172, 449-454 (1976)

Habener, J.F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Orci, L. — Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. J. Cell. Biol. 80, 715-731 (1979)

Harwood, R., Grant, M.E., Jackson, D.S. — The route of secretion of procollagen. The influence of $\alpha\alpha'$-bipyridyl, colchicine and antimycin A on the secretory process in embryonic chick tendon and cartilage cells. Biochem. J. 156, 81-90 (1976)

Hedman, K., Kurkinen, M., Alitalo, K., Vaheri, A., Johansson, S., Höök, M. — Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. J. Cell. Biol. 81, 83-91 (1979)

Hopkins, C.R., Farquhar, M.G.
Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries.
J. Cell. Biol. 59, 276-303 (1973)

Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., Burridge, K.
Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin - a transmembrane linkage.
Nature 320, 531-533 (1986)

Housley, T.J., Rowland, F.N., Ledger, P.W., Kaplan, J., Tanzer, M.L.
Effects of tunicamycin on the biosynthesis of procollagen by human fibroblasts.
J. Biol. Chem. 255, 121-128 (1980)

Hutton, J.J., Tappel, A.L., Udenfriend, S.
Cofactor and substrate requirements of collagen proline hydroxylase.
Arch. Biochem. Biophys. 118, 231-239 (1967)

Israel, H.W., Salpeter, M.M., Steward, F.C.
The incorporation of radioactive proline into cultured cells. Interpretations based on radioautography and electron microscopy.
J. Cell. Biol. 39, 698-715 (1968)

Jamieson, J.D., Palade, G.E.
Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell.
I. Role of the peripheral elements of the golgi complex.
J. Cell. Biol. 34, 577-596 (1967)

Jimenez, S.A., Yankowski, R. Secretion of unhydroxylated chick tendon procollagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 735-740 (1975)

Kao, W.W.-Y., Berg, R.A., Prockop, D.J. Ascorbate increases the synthesis of procollagen hydroxyproline by cultured fibroblasts from chick embryo tendons without activation of prolyl hydroxylase. Biochim. Biophys. Acta 411, 202-215 (1975)

Kao, W.W.-Y., Berg, R.A., Prockop, D.J. Kinetics for the secretion of procollagen by freshly isolated tendon cells. J. Biol. Chem. 252, 8391-8397 (1977)

Karrer, H.E. Electron microscope study of developing chick embryo aorta. J. ultrastruct. Res. 4, 420-454 (1960)

Kivirikko, K.J., Prockop, D.J. Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 782-789 (1967)

Koch, F., Pawlowski, P.J., Lukens, L.N. Inhibition of collagen synthesis in cultured cells by hypertonic culture medium. Arch. Biochem. Biophys. 178, 373-380 (1977)

Kopriwa, B.M. — A reliable, standardized method for ultrastructural electron microscopic radioautography. Histochemie 37, 1-17 (1973)

Kopriwa, B.M. — A comparison of various procedures for fine grain development in electron microscopic radioautography. Histochemistry 44, 201-224 (1975)

Krane, S.M. — Understanding genetic disorders of collagen. New Engl. J. Med. 303, 101-102 (1980)

Krieg, T., Aumailley, M., Dessau, W., Wiestner, M., Müller, P. — Synthesis of collagen by human fibroblasts and their SV 40 transformants. Exp. Cell Res. 125, 23-30 (1980)

Kruse, N.J., Bornstein, P. — The metabolic requirements for transcellular movement and secretion of collagen. J. Biol. Chem. 250, 4841-4847 (1975)

Leblond, C.P. — Elaboration of dentinal collagen in odontoblasts as shown by radioautography after injection of labelled glycine and proline. Ann. Histochim. 8, 43-50 (1963)

Ledger, P.W., Uchida, N., Tanzer, M.L. Immunocytochemical localization of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: Effect of the monovalent ionophore, monensin. J. Cell. Biol. 87, 663-671 (1980)

Lie, S.O., Schofield, B.H., Taylor, H.A., Doty, S.B. Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: dependence on medium pH. Pediat. Res. 7, 13-19 (1973)

Lowther, D.A., Green, N.M., Chapman, J.A. Morphological and chemical studies of collagen formation. II. Metabolic activity of collagen associated with subcellular fractions of guinea-pig granulomata. J. biophys. biochem. Cytol. 10, 373-388 (1961)

Lucky, A.W., Mahoney, M.J., Barrnett, R.J., Rosenberg, L.E. Electron microscopy of human skin fibroblasts in situ during growth culture. Exp. Cell. Res. 92, 383-393 (1975)

Marchi, F., Leblond, C.P. Collagen biogenesis and assembly into fibrils as shown by ultrastructural and ^{3}H-proline radioautographic studies on the fibroblasts of the rat foot pad. Amer. J. Anat. 168, 167-197 (1983)

Marchi, F., Leblond, C.P.
Radioautographic characterization of successive compartments along the rough endoplasmic reticulum - golgi pathway of collagen precursors in foot pad fibroblasts of ^{3}H-prolin-injected rats.
J. Cell. Biol. 98, 1705-1709 (1984)

Maug, A.
Vergrößerung des rauhen endoplasmatischen Reticulums in Hautfibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämie.
Dissertation, Düsseldorf (1981)

Merker, H.J.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen.
Z. Zellforsch. 53, 411-430 (1961)

Miller, L.R., Gordon, G.B., Bensch, K.G.
Cytologic alterations in hereditary metabolic disorders.
I. The effects of galactose on galactosemic fibroblasts in vitro.
Lab. Invest. 19, 428-436 (1968)

Movat, H.Z., Fernando, N.V.
The fine structure of connective tissue.
I. The fibroblast.
Exp. Mol. Pathol. 1, 509-534 (1962)

Müller, P.K., Lemmen, C., Gay, S., Meigel, W.N.
Disturbance in the regulation of the type of collagen synthesized in a form of osteogenesis imperfecta.
Eur. J. Biochem. 59, 97-104 (1975)

Myllylä, R., Tuderman, L., Kivirikko, K.J.
Mechamism of the prolyl hydroxylase reaction.
2. Kinetic analysis of the reaction sequence.
Eur. J. Biochem. 80, 349-357 (1977)

Nadler, N.J.
The interpretation of grain counts in electron microscope radioautography.
J. Cell. Biol. 49, 877-882 (1971)

Nelson, D.M., Enders, A.C., King, B.F.
Cytological events involved in protein synthesis in cellular and syncytial trophoblast of human placenta.
An electron microscope autoradiographic study of ^{3}H-leucine incorporation.
J. Cell. Biol. 76, 400-417 (1978)

Neumann, D.
Technik der elektronenoptischen Autoradiographie in der Biologie.
Acta histochem. 33, 191-213 (1969)

Nist, C.,
von der Mark, K.,
Hay, E.D.,
Olsen, E.R.,
Bornstein, P.,
Ross, R.,
Dehm, P.
Location of procollagen in chick corneal and tendon fibroblasts with ferritin-conjugated antibodies.
J. Cell. Biol. 65, 75-87 (1975)

Nolan, J.C.,
Cardinale, G.J.
The formation of hydroxyproline during collagen biosynthesis in cells grown in the total absense of ascorbate.
Fed. Proc. 36, 677 (1977)

Palade, G.E.
Studies on the endoplasmic reticulum.
II. Simple dispositions in cells in situ.
J. biophys. biochem. Cytol. 1, 567-582 (1955)

Palade, G.E.
The endoplasmic reticulum.
J. biophys. biochem. Cytol. 2, No. 4 Suppl., 85-98 (1956)

Palade, G.E.
Intracellular aspects of the process of protein synthesis.
Science 189, 347-358 (1975)

Parker, F.,
Odland, G.F.
A correlative histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell.
Am. J. Pathol. 48, 197-239 (1966)

Paz, M.A., Gallop, P.M. — Collagen synthesized and modified by aging fibroblasts in culture. In Vitro 11, 302-312 (1975)

Peltonen, L., Palotie, A., Hayashi, T., Prockop, D.J. — Thermal stability of type I and type III procollagens from normal human fibroblasts and from a patient with osteogenesis imperfecta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 162-166 (1980)

Perdue, J.F. — The distribution, ultrastructure and chemistry of microfilaments in cultured chick embryo fibroblasts. J. Cell Biol. 58, 265-283 (1973)

Peterkofsky, B. — The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of culture fibroblasts. Arch. Biochem. Biophys. 152, 318-328 (1972)

Peterkofsky, B., Udenfriend, S. — Enzymatic hydroxylation of proline in microsomal polypeptide leading to formation of collagen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 335-342 (1965)

Peters, J.R., Ashley, C.A. — An artifact in radioautography due to binding of free amino acids to tissues by fixatives. J. Cell Biol. 33, 53-60 (1967)

Pinnell, S.R. — Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: A rewiew. Yale J. Biol. Med. 58, 553-559 (1985)

Prockop, D.J. — The synthesis of type I collagen fibers and potential inhibitors of the process. In: Myelofibrosis and the Biology of connective Tissue, 81-88, A. Liss Inc., New York (1984)

Prockop, D.J., Cooper, G.W. — Hydroxylation of proline and the intracellular accumulation of a polypeptide precursor of collagen. Science 152, 92-94 (1966)

Prockop, D.J., Kivirikko, K.J. — Heritable diseases of collagen. New Engl. J. Med. 311, 376-386 (1984)

Prockop, D.J., Kivirikko, K.J., Tuderman, L., Guzman, N.S. — The biosynthesis of collagen and its disorders. New Engl. J. Med. 301, No. 1, No. 2 (1979)

Revel, J.-P., Hay, E.D. — An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. Z. Zellforschung 61, 110-144 (1963)

Ross, R., Benditt, E.P.
Wound healing and collagen formation.
I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope.
J. biophys. biochem. Cytol. 11, 677-700 (1961)

Ross, R., Benditt, E.P.
Wound healing and collagen formation.
III. A quantitative radioautographic study of the utilization of proline-^{3}H in wounds from normal and scorbutic guinea pigs.
J. Cell. Biol. 15, 99-108 (1962)

Ross, R., Benditt, E.P.
Wound healing and collagen formation.
V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-^{3}H utilization by fibroblasts.
J. Cell. Biol. 27, 83-106 (1965)

Rowe, D.W., Moen, R.C., Davidson, J.M., Byers, P.H., Bornstein, P., Palmiter, R.D.
Correlation of procollagen mRNA levels in normal and transformed chick embryo fibroblasts with different rates of procollagen synthesis.
Biochemistry 17, 1581-1590 (1978)

Russell, S.B., Russell, J.D., Trupin, K.M.
Collagen synthesis in human fibroblasts: Effects of ascorbic acid and regulation by hydrocortisone.
J. Cell. Physiol. 109, 121-131 (1981)

Salpeter, M.M. — ^{3}H-Prolin incorporation into cartilage: electron microscopic autoradiographic observations. J. Morphol. 124, 387-421 (1968)

Salpeter, M.M., Bachmann, L. — Autoradiography with the electron microscope. A procedure for improving resolution sensitivity and contrast. J. Cell. Biol. 22, 469-477 (1964)

Salpeter, M.M., Bachmann, L. — Assessment of technical steps in electron microscope autoradiography. Int. Sym. Cell. Biol. 4, 23-41 (1965)

Salpeter, M.M., Bachmann, L. — Autoradiography In: Principles and Techniques of Electron Microscopy, Vol. 2, 221-278 Litton Educational Publishing (1972)

Salpeter, M.M., Bachmann, L., Salpeter, E.E. — Resolution in electron microscope radioautography. J. Cell. Biol. 41, 1-20 (1969)

Salpeter, M.M., Farquhar, M.G. — High resolution analysis of the secretory pathway in mammotrophs of the rat anterior pituitary. J. Cell. Biol. 91, 240-246 (1981)

Salpeter, M.M., McHenry, F.A., Salpeter, E.E. — Resolution in electron microscope autoradiography. J. Cell. Biol. 76, 127-145 (1978)

Schafer, I.A., Silverman, L., Sullivan, J., Robertson, W.
Ascorbic acid deficiency in cultured human fibroblasts.
J. Cell. Biol. 34, 83-95 (1967)

Schwartz, R.J., Bissell, M.J.
Dependence of the differentiated state on the cellular environment: Modulation of collagen synthesis in tendon cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4453-4457 (1977)

Schwarz, W.
Heutige Vorstellungen über die ultramikroskopische Struktur des Bindegewebes.
In: Struktur und Stoffwechsel des Bindegewebes, 106-178
Ed. Hauss, Losse, Thieme, Stuttgart (1960)

Schwarz, W., Merker, H.J., Kutzsche, A.
Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in Fibroblastenkulturen.
Z. Zellforsch. 56, 107-124 (1962)

Sheldon, H.
Observations on the production of matrix by bone and cartilage cells.
In: The proc. of the European Reg. Conf. on Electron Microscopy, 786-790, Delft (1960)
Ed. Honwink, Spit, De nederlandse Vereniging voor Electronenmicroscopie, Delft (1961)

Singer, J.J. — The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. Cell 16, 675-685 (1979)

Sodek, J. — A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using microassay. Arch. Oral Biol. 22, 655-665 (1977)

Stone, N., Meister, A. — Function of ascorbic acid to collagen hydroxyproline. Nature 194, 555-557 (1962)

Tartakoff, A., Vassalli, P. — Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. J. Cell. Biol. 79, 694-707 (1978)

Uchida, N., Smilowitz, H., Ledger, P.W., Tanzer, M.L. — Kinetic studies of the intracellular transport of procollagen and fibronectin in human fibroblasts: Effects of the monovalent ionophore, monensin. J. Biol. Chem. 255, 8638-8644 (1980)

Uchida, N., Smilowitz, H., Tanzer, M.L. — Monovalent ionophores inhibit secretion of procollagen and fibronectin from cultured human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1868-1872 (1979)

Uitto, J., Prockop, D.J.
Incorporation of proline analoges into collagen polypeptides: Effects on the production of extracellular procollagen and on the stability of the triple-helical structure of the molecule.
Biochim. Biophys. Acta 336, 234-251 (1974)

Uitto, J., Prockop, D.J.
Synthesis and secretion of underhydroxylated procollagen at various temperatures by cells subject to temporary anoxia.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 414-423 (1974)

Weinstock, M.
Collagen formation - observations on its intracellular packaging and transport.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 129, 455-470 (1972)

Weinstock, M., Leblond, C.P.
Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualised by radioautography after ^{3}H-proline administration.
J. Cell. Biol. 60, 92-127 (1974)

Williams, M.A.
The analysis of electron microscope autoradiographs.
In: Quantitative methods in biology, 85-169
Ed.: A.M. Glauert, North-Holland, Amsterdam (1977)

VII. Abkürzungsverzeichnis

AR	Autoradiographie
DMEM	Dulbecco's Modification des Eagleschen Mediums
FCS	Fötales Kälberserum
HD	Halbwertsdistanz
HR	Halbwertsradius
NS	Normalserum
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
SK	Silberkorn
TCA	Trichloressigsäure

EX	Extrazellulärraum
G	Grundcytoplasma
GO	Golgi-Apparat
L	Lipidtropfen
LY	Lysosom
MF	Mikrofilament
MI	Mitochondrium
MT	Mikrotubuli
N	Kern
PP	Peripheres Cytoplasma
P	Kernpore
rER	rauhes endoplasmatisches Reticulum
V	Vesikel

VIII. Abbildungen

Abb. 1

Silberhalogenid-Monoschicht der Ilford L 4 Emulsion, Schichtdicke 1.500 A.

24.000 x

Abb. 2

Schematische Darstellung vom Aufbau des autoradiographischen Präparates bei der elektronenmikroskopischen Auswertung.

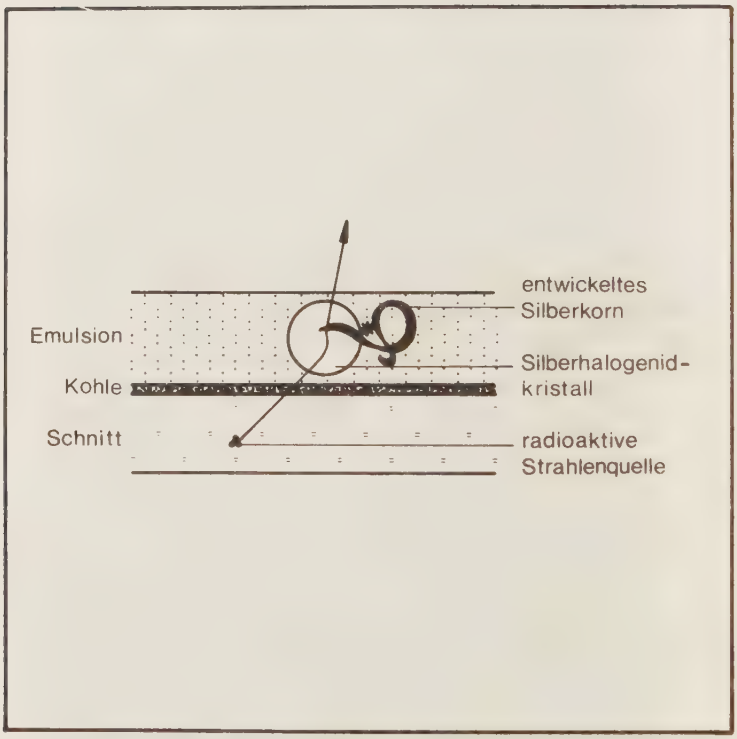


Abb. 3

Schematische Darstellung von der Entstehung eines Silberkorns und seiner Position in Bezug auf die Strahlenquelle im Ultradünnschnitt. Der Mittelpunkt des Silberkorns (Sternchen) ist als Mittelpunkt seiner längsten Achse definiert. (nach Salpeter et al., 1969, verändert)

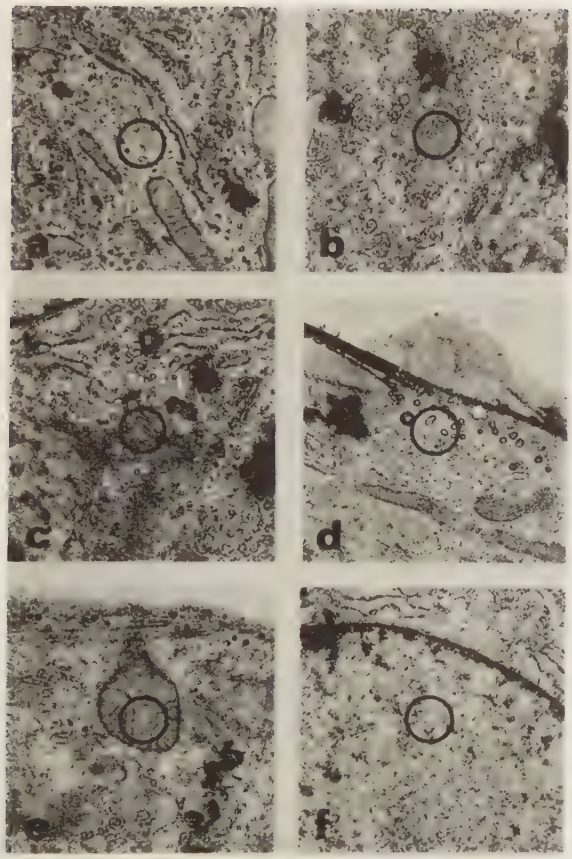


Abb. 4

Darstellung der "primären Kompartimente" als potentielle Strahlenquellen, die von einem HR-Kreis umschlossen werden: a) GP, b) rER, c) GO, d) PP, e) MI, f) N

Originalvergrößerung der Auswertung 16.000 x

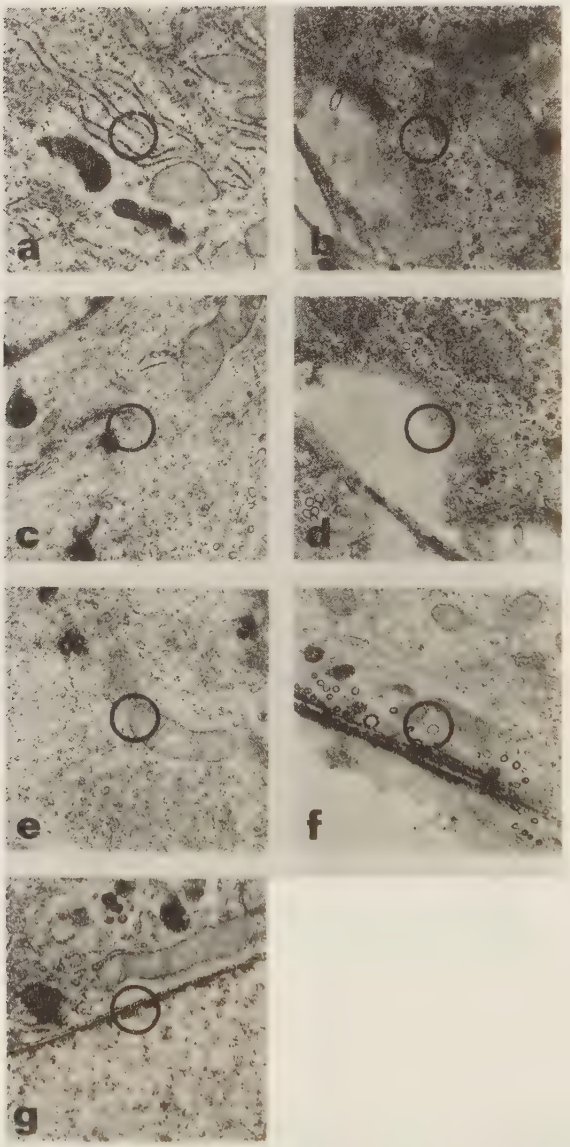


Abb. 5

Darstellung der "kombinierten Kompartimente" als potentiell
Strahlenquellen, die von einem HR-Kreis umschlossen werden:
a) rER/GP, b) rER/PP, c) GO/GP, d) PP/EX, e) MI/GP,
f) MI/PP, g) N/GP

Originalvergrößerung der Auswertung 16.000 x

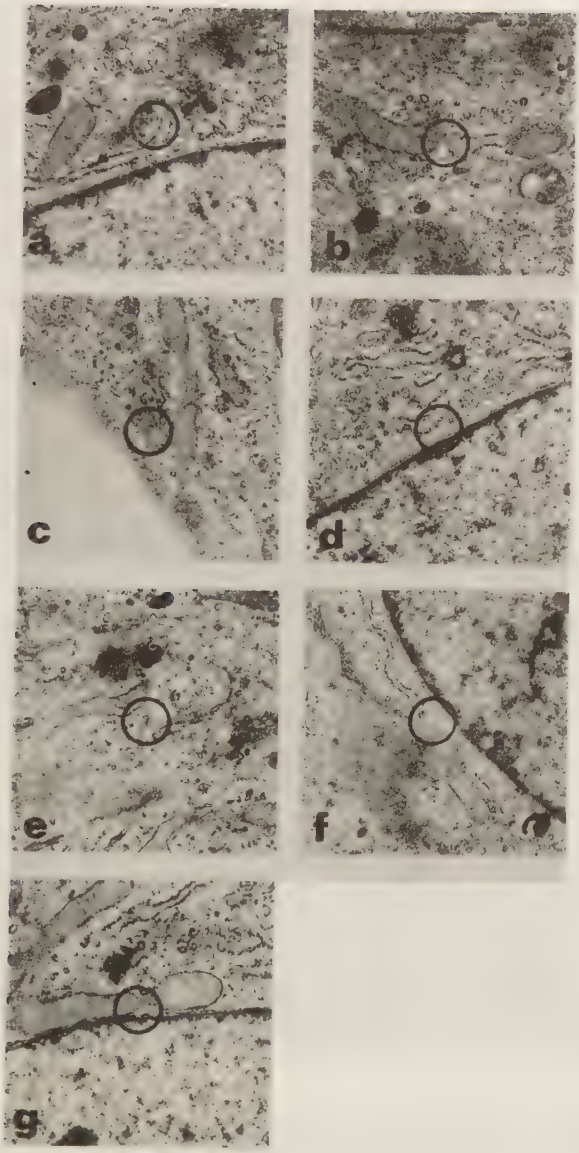


Abb. 6

Darstellung der "kombinierten Kompartimente" als potentielle Strahlenquellen, die von einem HR-Kreis umschlossen werden: a) rER/GO/GP, b) rER/MI/GP, c) rER/MI/PP, d) rER/N/GP, e)GO/MI/GP, f) GO/N/GP, g) N/MI/GP

Originalvergrößerung der Auswertung 16.000 x

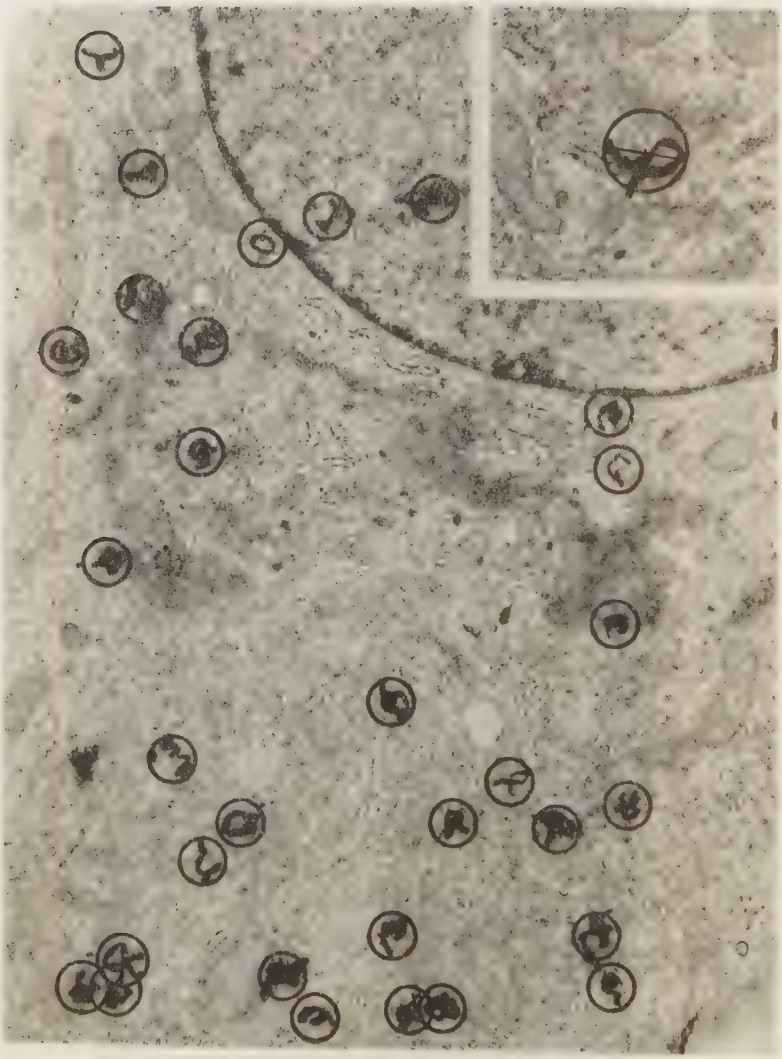


Abb. 7

Ermittlung der "beobachteten Kornverteilung" durch Zuordnung von Strukturen innerhalb von HR-Kreisen um jedes Silberkorn zu definierten Zellkompartimenten.
Originalvergrößerung der Auswertung 16.000 x

Ausschnitt: Plazierung des HR-Kreises in Bezug auf das Silberkorn, dessen Mittelpunkt als Mittelpunkt seiner längsten Achse definiert ist.
32.000 x

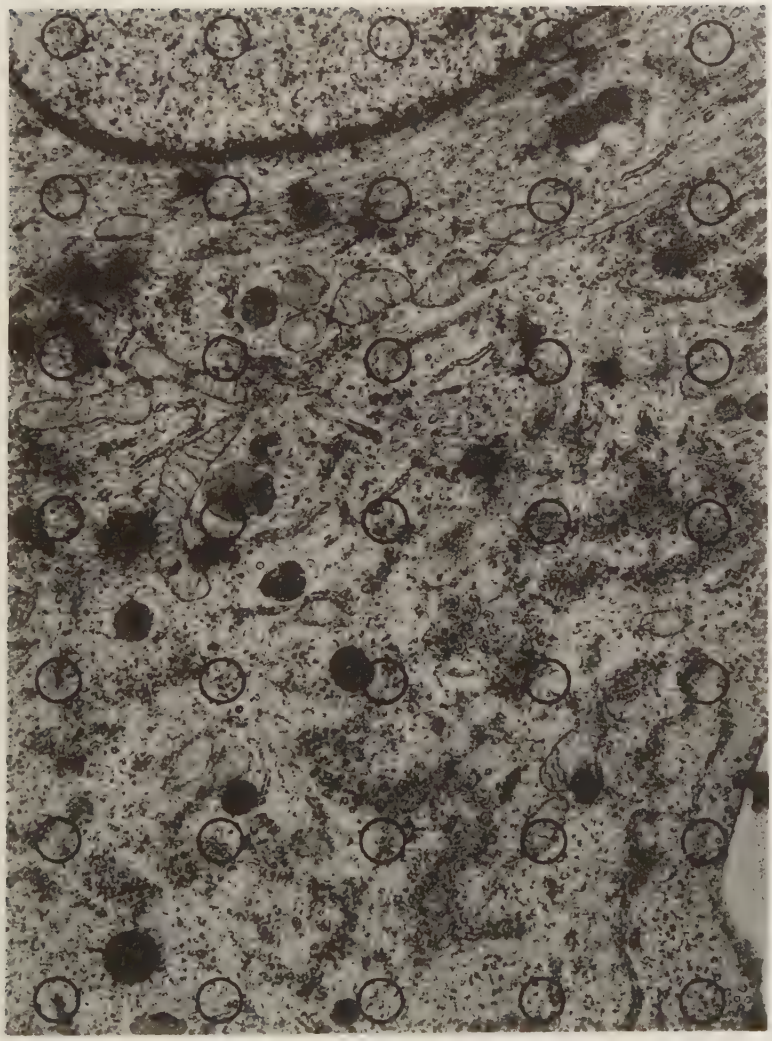


Abb. 8

Ermittlung der "erwarteten Kornverteilung" durch Zuordnung der Strukturen innerhalb von HR-Kreisen eines regelmäßigen Rasters zu definierten Zellkompartimenten.

Originalvergrößerung der Auswertung 16.000 x

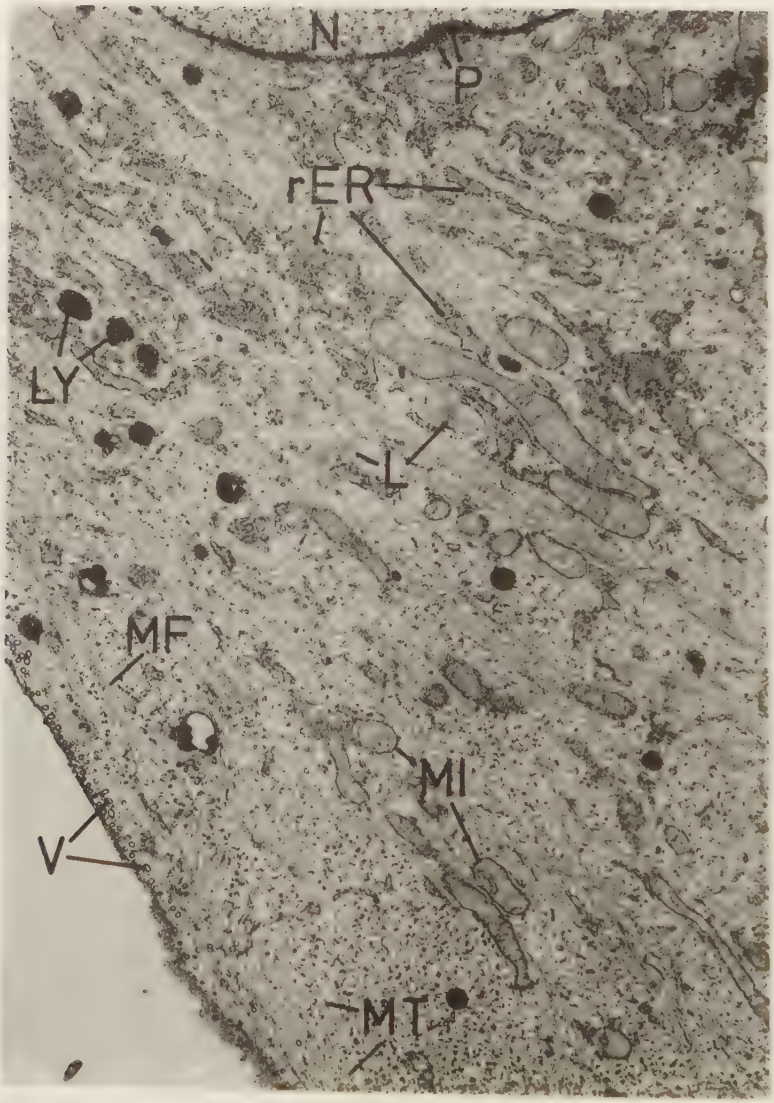


Abb. 9

Ausschnitt eines Fibroblasten mit normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER).
N = Kern, P = Kernpore, GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium, LY = Lysosom, L = Lipidtropfen, MF = Mikrofilamente, MT = Mikrotubuli, V = Vesikel

12.000 x

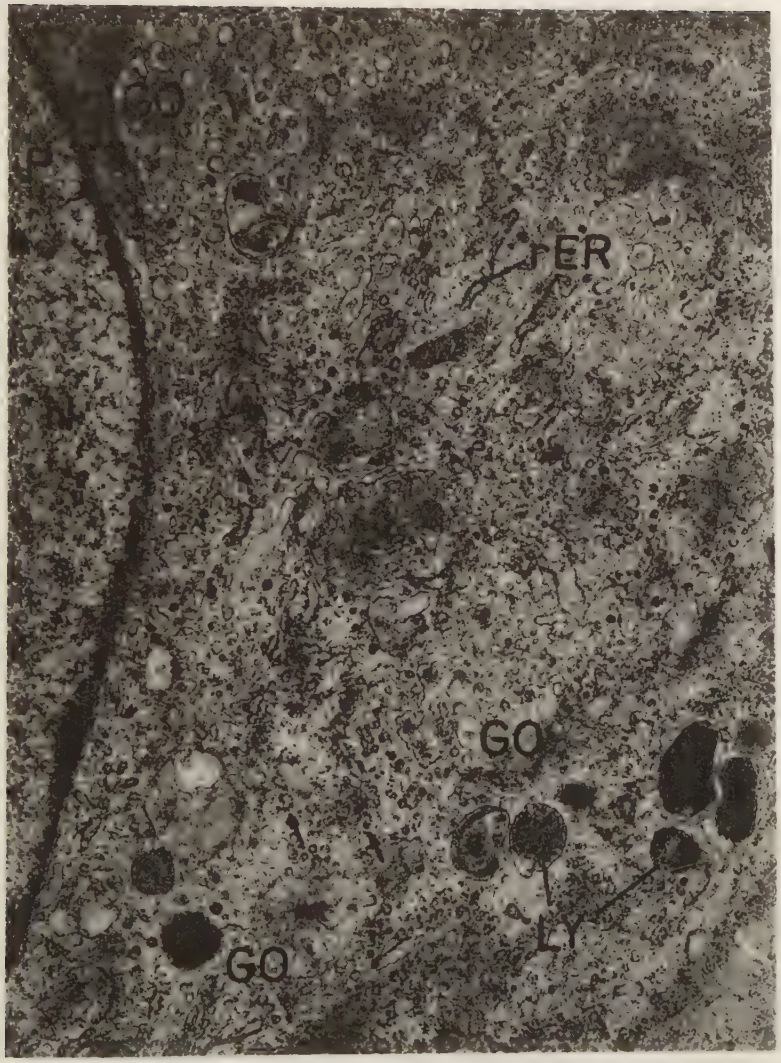


Abb. 10

Golgi-Bereich eines Fibroblasten mit normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER). Die Ribosomen an der Membran des rER sind spiralförmig angeordnet (Pfeile). N = Kern, P = Kernpore, GO = Golgi-Apparat, LY = Lysosom

24.000 x

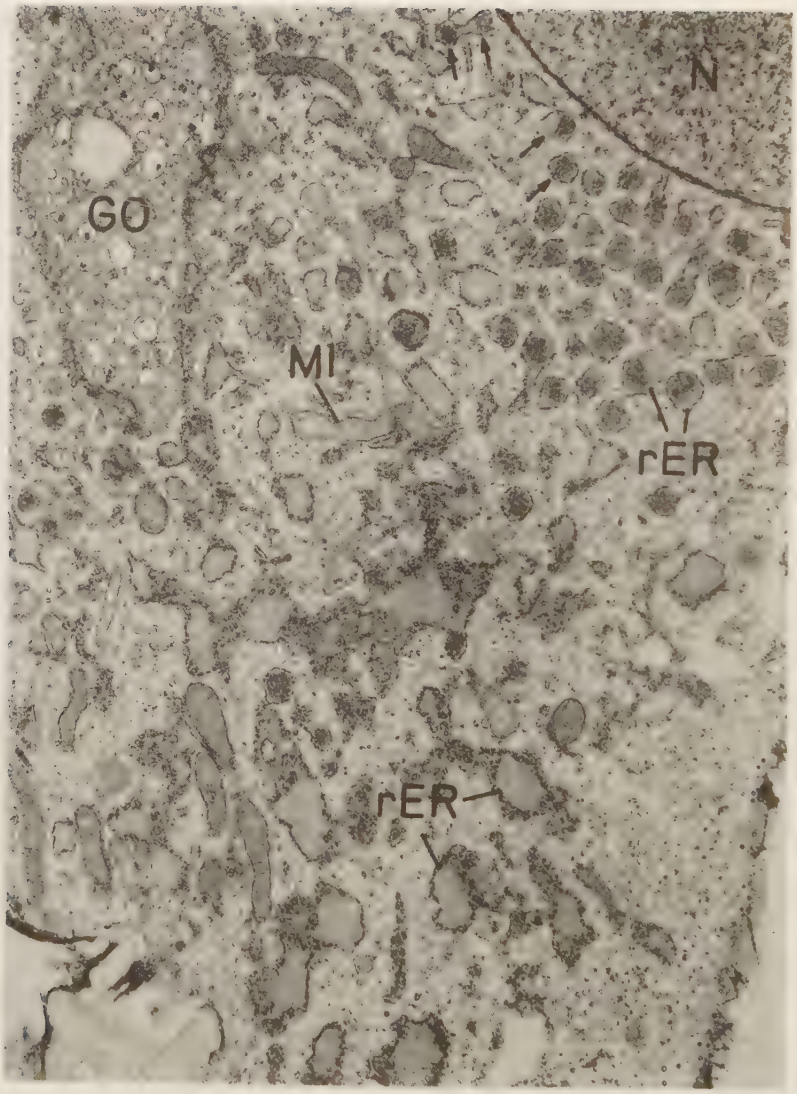


Abb. 11

Ausschnitt eines Fibroblasten mit verschiedenen Formen des dilatierten rauhen endoplasmatischen Reticulums (rER). In den kugelig aufgeblähten rER-Cisternen im oberen Bildbereich ist elektronendichtes Material in der Lumenmitte konzentriert (Pfeile).
N = Kern, GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium

12.000 x

Abb. 1:

Ausschnitt eines Fibroblasten mit erweitertem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER).
N = Kern, P = Kernpore, MI = Mitochondrium, L = Lipidtropfen

24.000 x

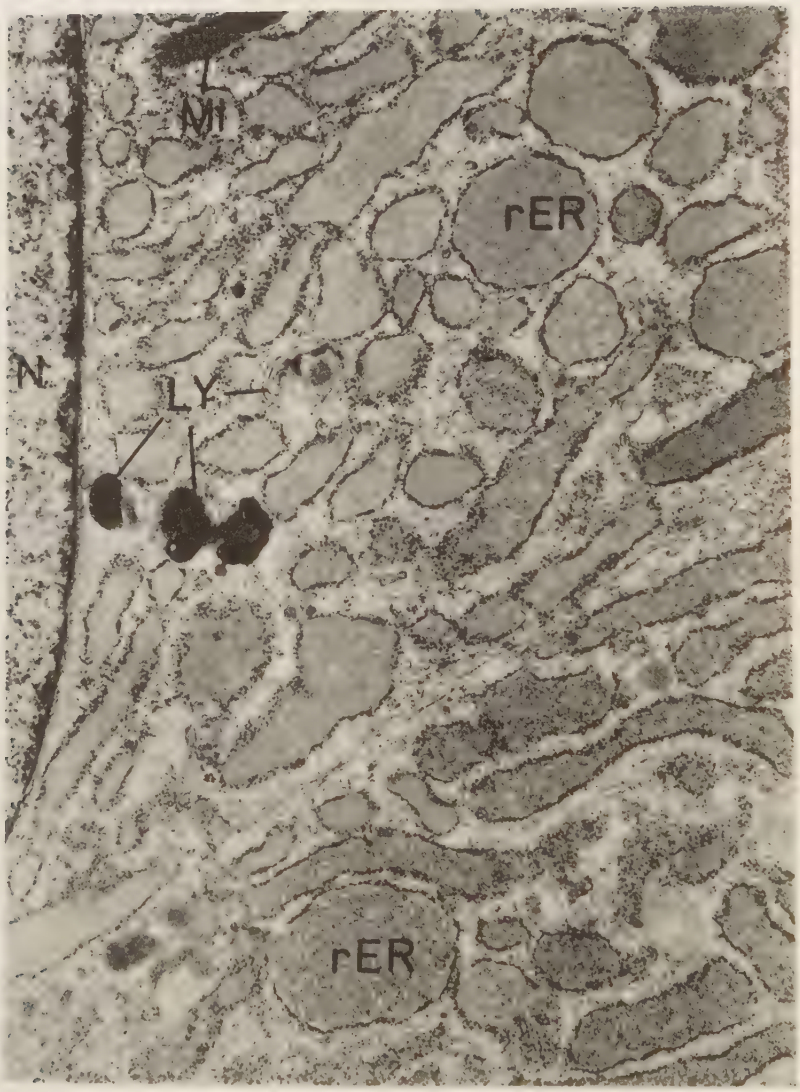


Abb. 13

Ausschnitt eines Fibroblasten mit erweitertem, kugelig geblähtem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER). Die rER-Cisternen in der unteren Bildhälfte enthalten granuläres Material.
N = Kern, MI = Mitochondrium, LY = Lysosom

24.000 x

Abb. 14

Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelldichte von Fibroblasten, gezüchtet vom 1.-3. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.

160 x

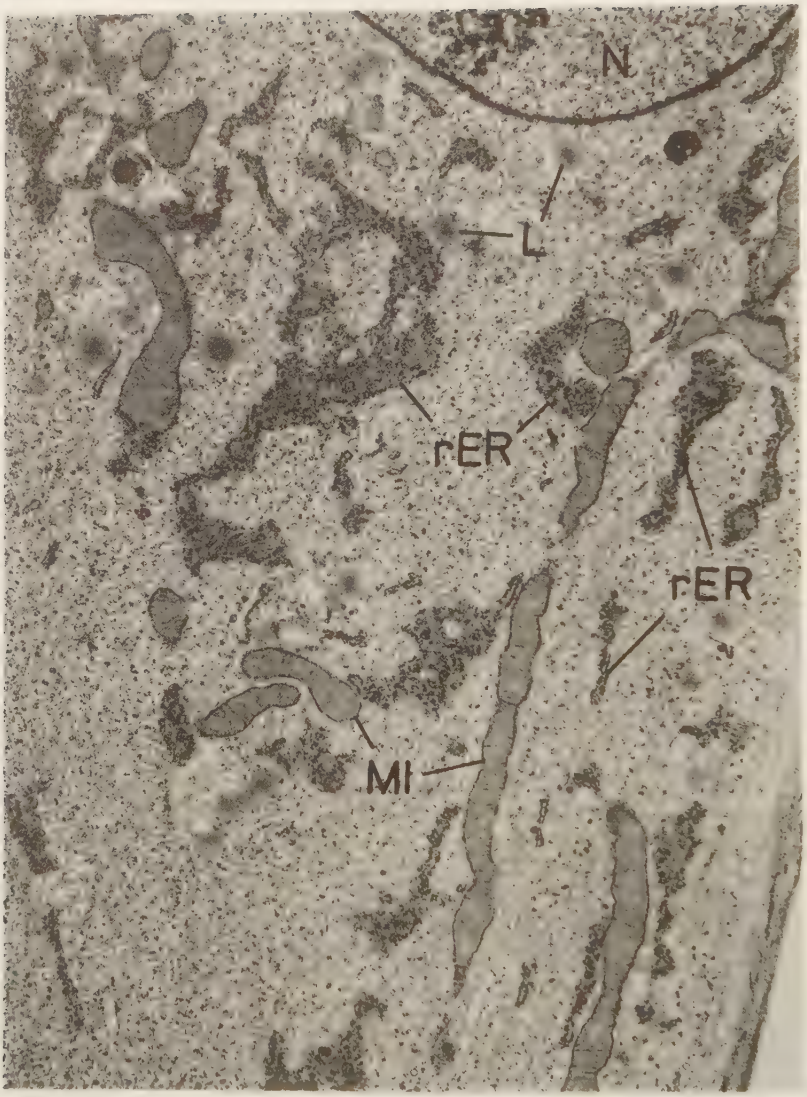


Abb. 15

Fibroblast mit normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER), gezüchtet vom 1.-3. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.
N = Kern, MI = Mitochondrium, L = Lipidtropfen

12.000 x

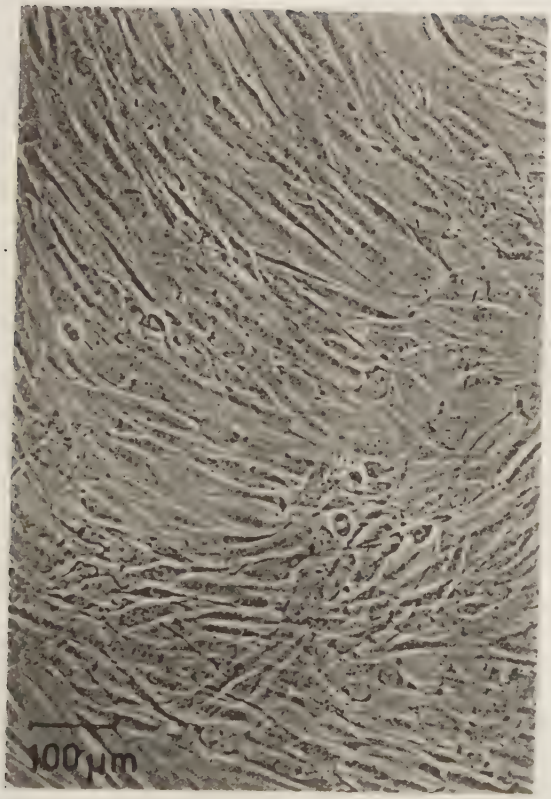


Abb. 16

Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelldichte von Fibroblasten, gezüchtet vom 1.-6. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.
160 x

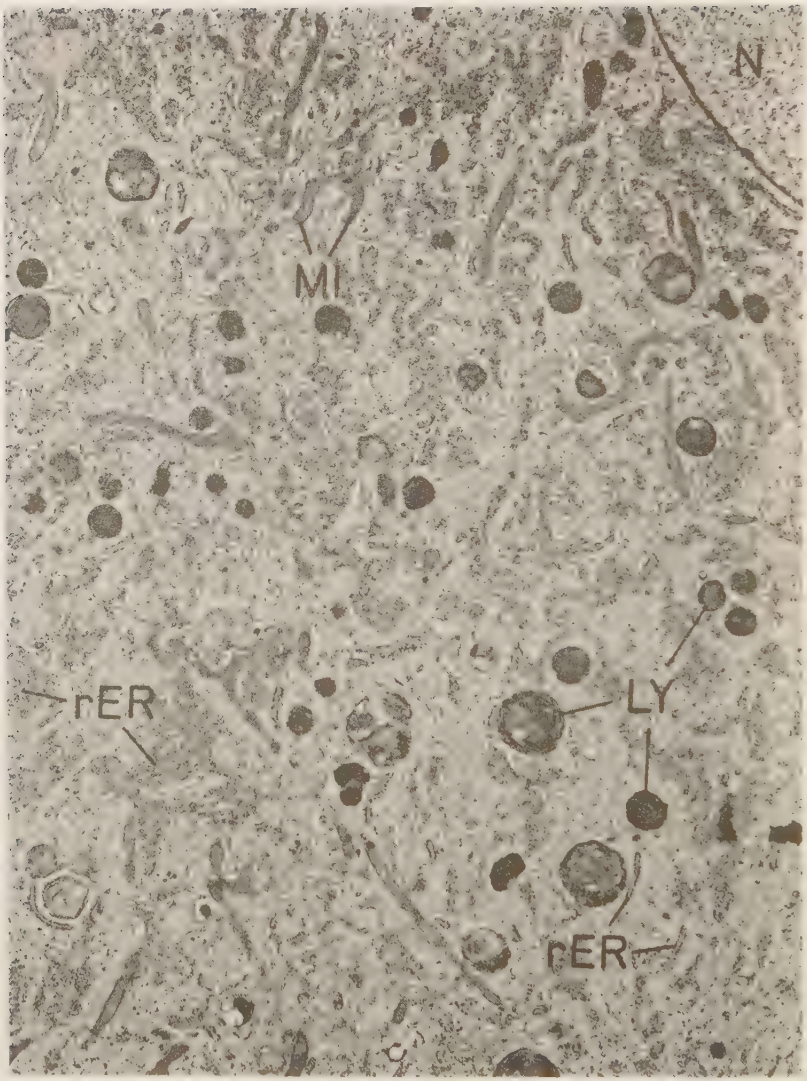


Abb. 17

Fibroblast mit normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER), gezüchtet vom 1.-6. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.
N = Kern, MI = Mitochondrium, LY = Lysosom

12.000 x

Abb. 18

Lichtmikroskopische Aufnahme der Zelldichte von Fibroblasten, gezüchtet vom 1.-10. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.

160 x

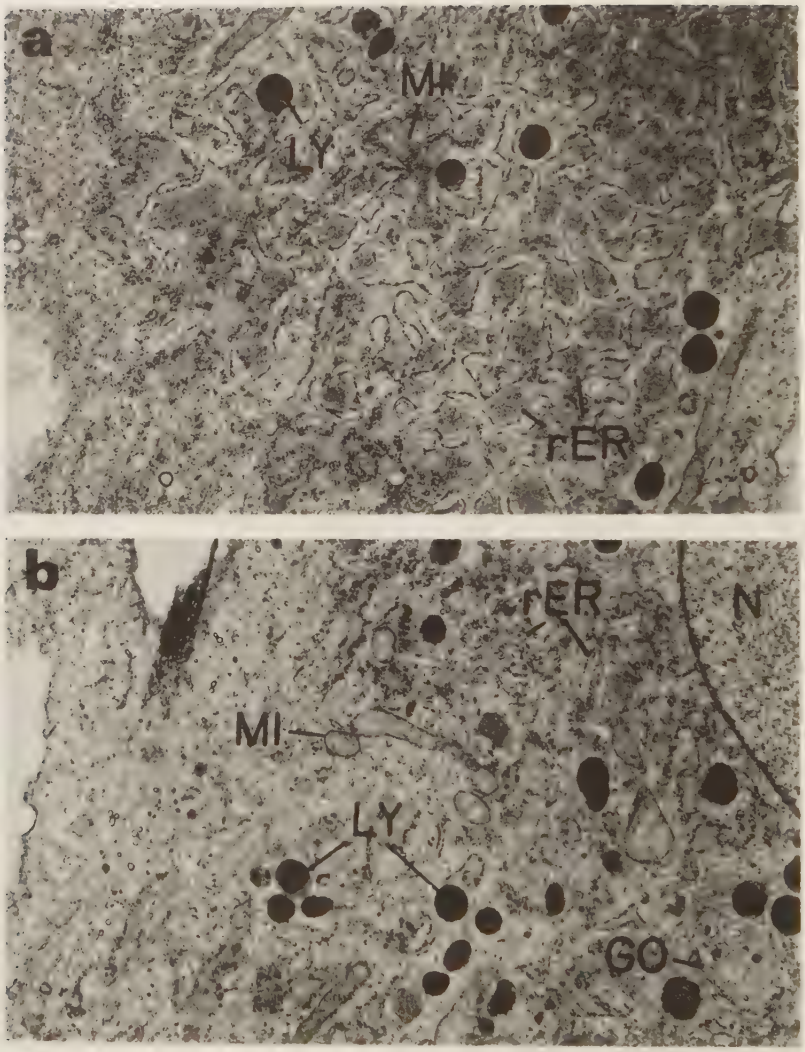


Abb. 19

Fibroblasten mit a) dilatiertem und b) normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER), gezüchtet vom 1.-10. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.
N = Kern, GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium, LY = Lysosom

12.000 x

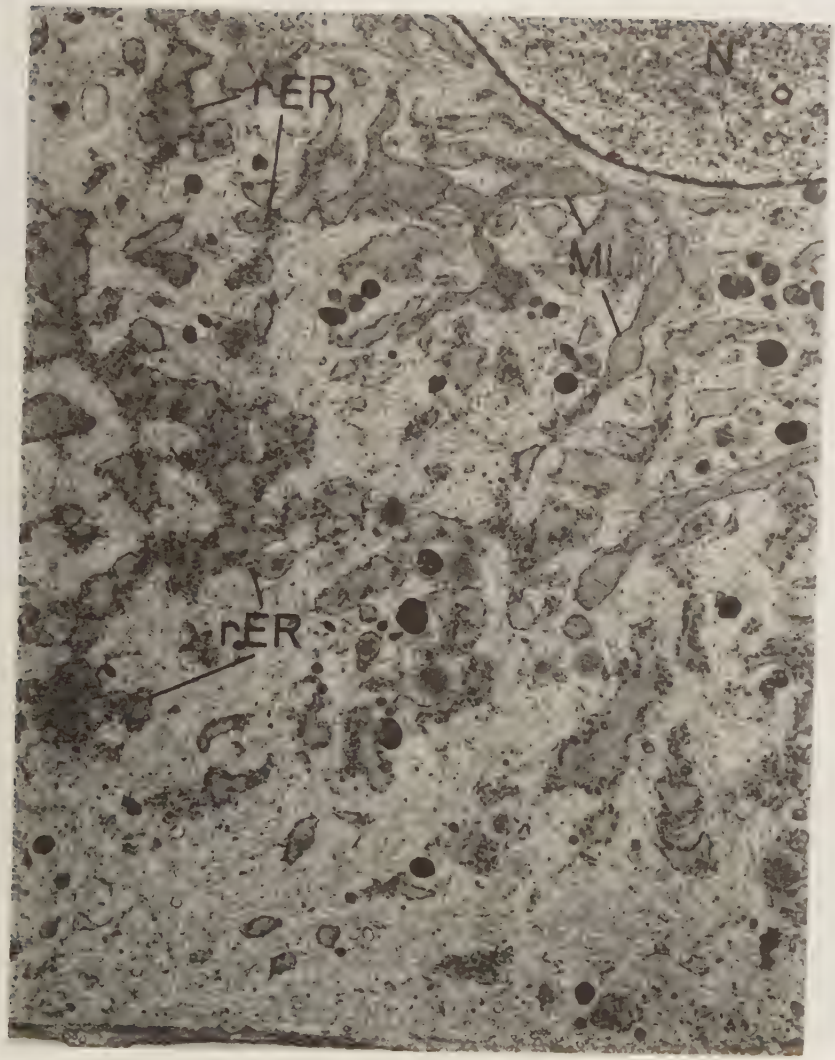


Abb. 20

Fibroblast mit dilatiertem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER), gezüchtet vom 1.-13. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS.
N = Kern, MI = Mitochondrium

12.000 x

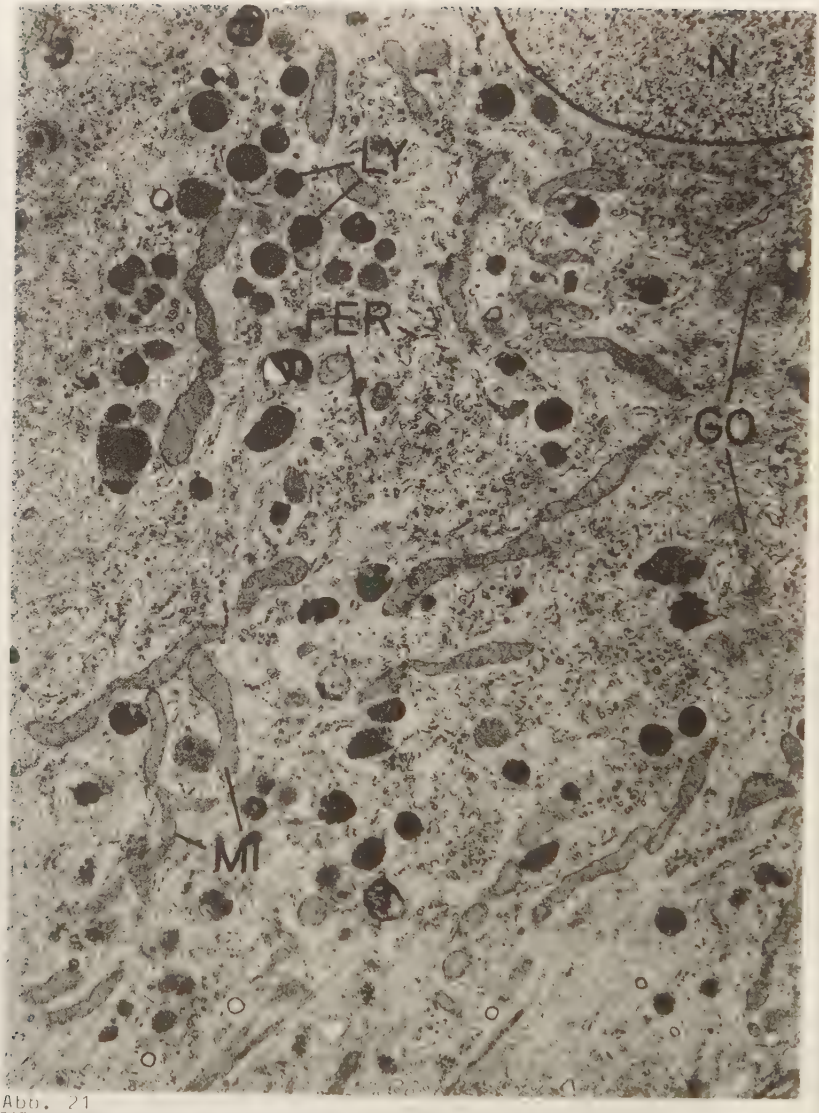


Abb. 21

Fibroblast mit normalem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER) nach 13 Tagen, gezüchtet vom 1.-10. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS und vom 11.-13. Tag in DMEM + 10 % NS + 50 µg Ascorbinsäure/ml.
N = Kern, GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium, LY = Lysosom

12.000 x

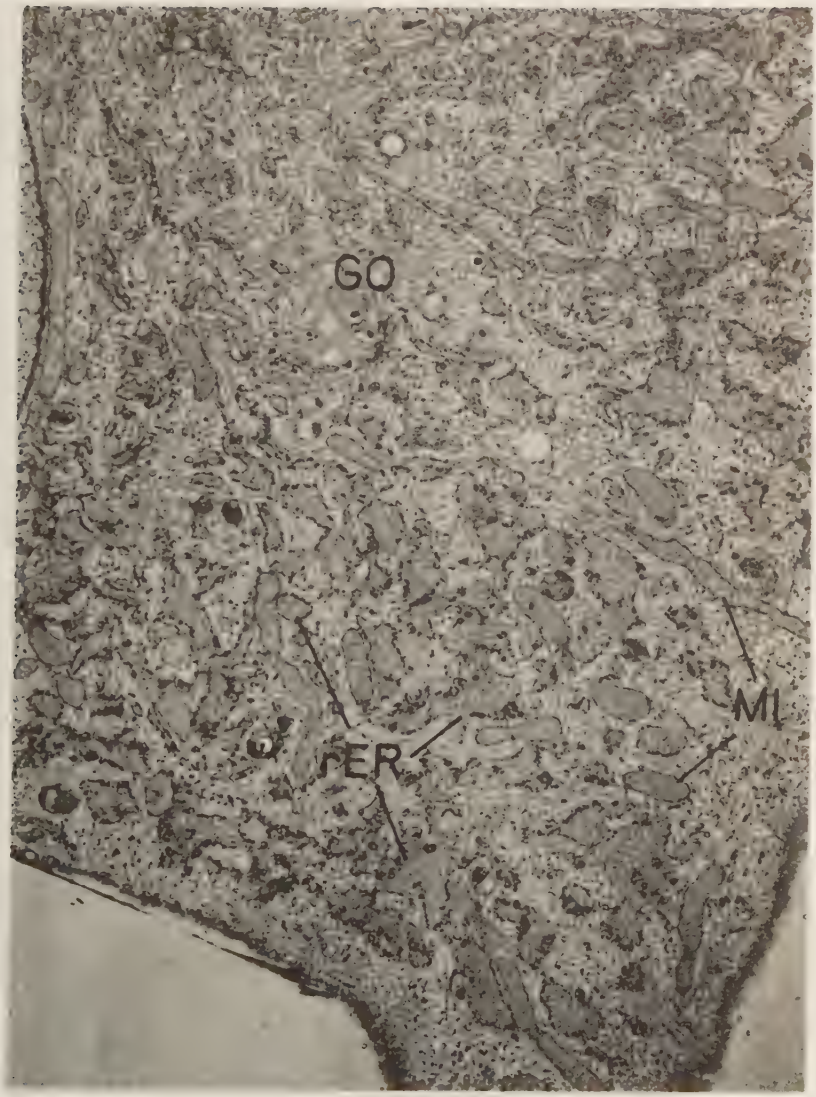


Abb. 22

Fibroblast mit dilatiertem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER) nach 6 Tagen, gezüchtet vom 1.-3. Tag nach Ansatz in DMEM + 10 % NS und vom 4.-6. Tag in DMEM + 1 % NS.
GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium

12.000 x

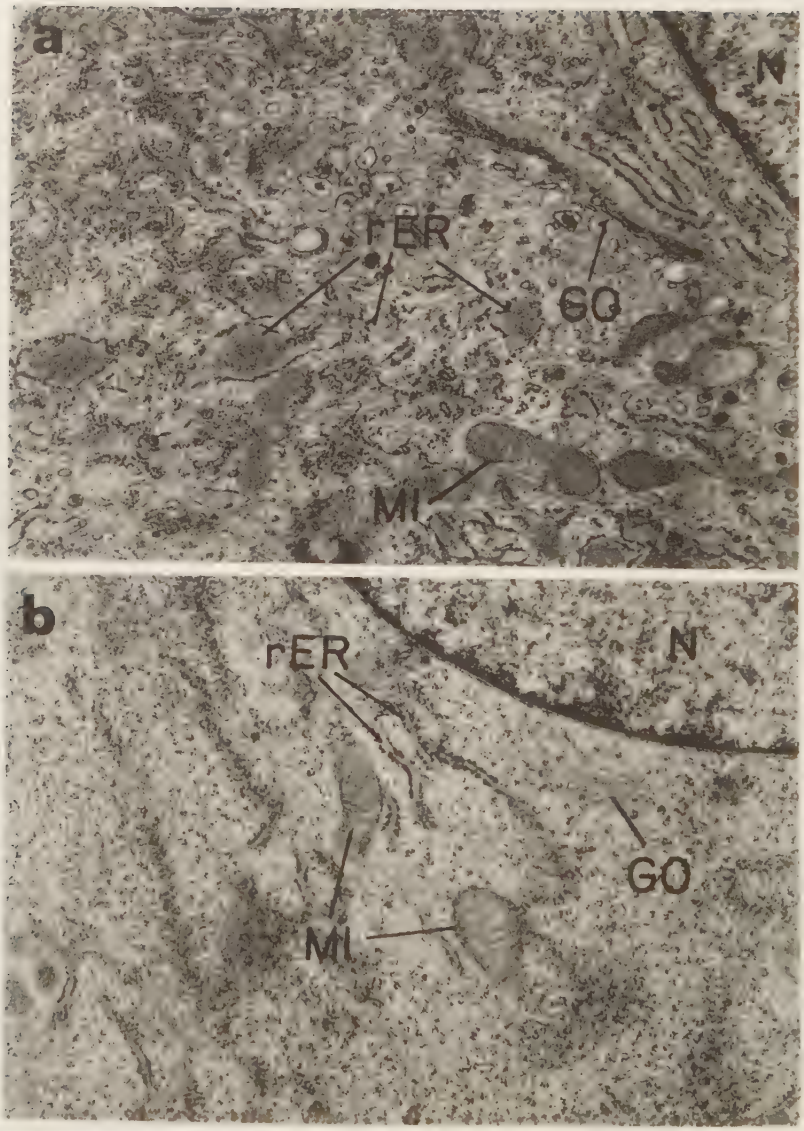


Abb. 23

Fibroblast mit a) dilatiertem und b) normalem rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER) zum Zeitpunkt der biochemischen und autoradiographischen Versuche :
a) gezüchtet vom 1.-3. Tag nach Ansatz im DMEM + 10 % NS und vom 4.-6. Tag nach Ansatz in DMEM + 1 % NS,
b) gezüchtet vom 1.-6. Tag in DMEM + 10 % NS + 50 µg Ascorbinsäure/ml.
N = Kern, GO = Golgi-Apparat, MI = Mitochondrium

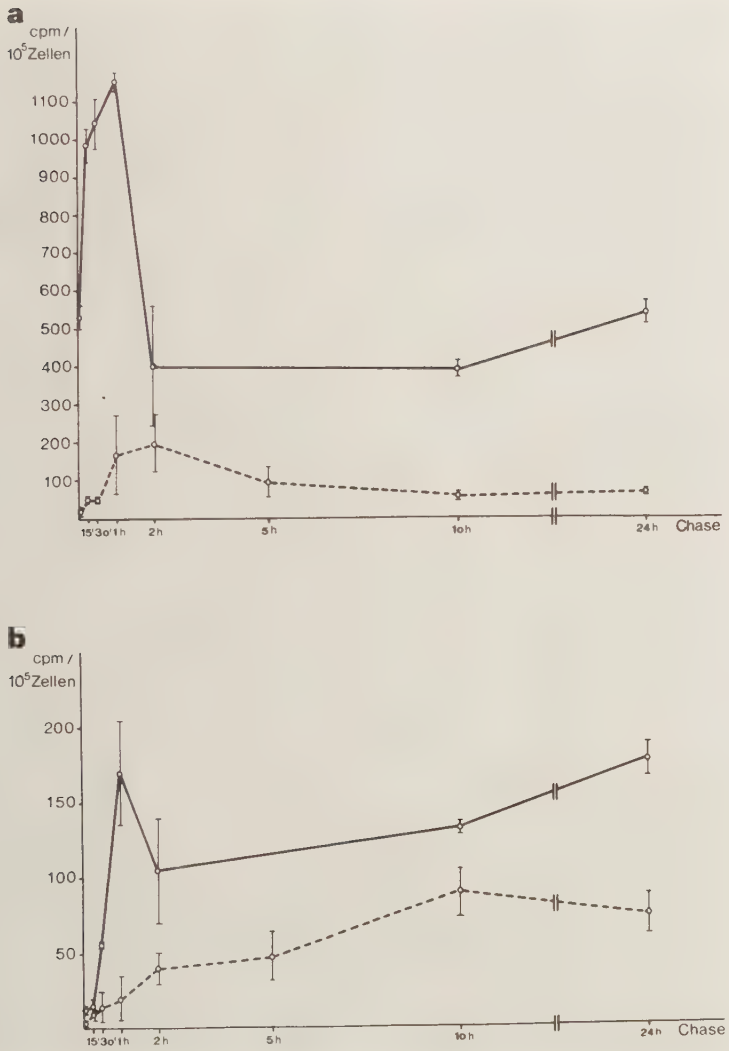


Abb. 24

^{3}H-Protein nach einem 5-Minuten-Pulse mit ^{3}H-Prolin (50 µCi/ml) bei Fibroblasten mit normalem rER (———) und bei Fibroblasten mit dilatiertem rER (----)
a) in den Zellen
b) im Kulturmedium

Mittelwerte aus 3 Kulturschalen

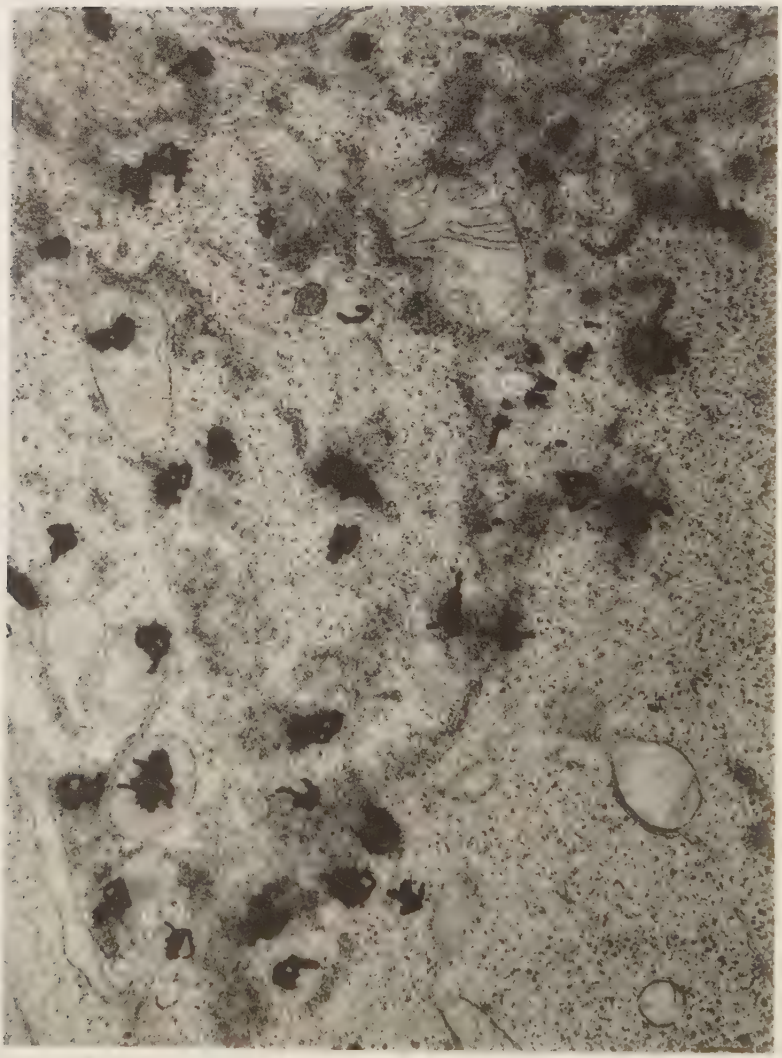


Abb. 25

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit normalem rER *15 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Die Silberkörner befinden sich vorwiegend über den schmalen Cisternen des rER; auch der Golgi-Apparat enthält bereits radioaktives Material.

16.000 x

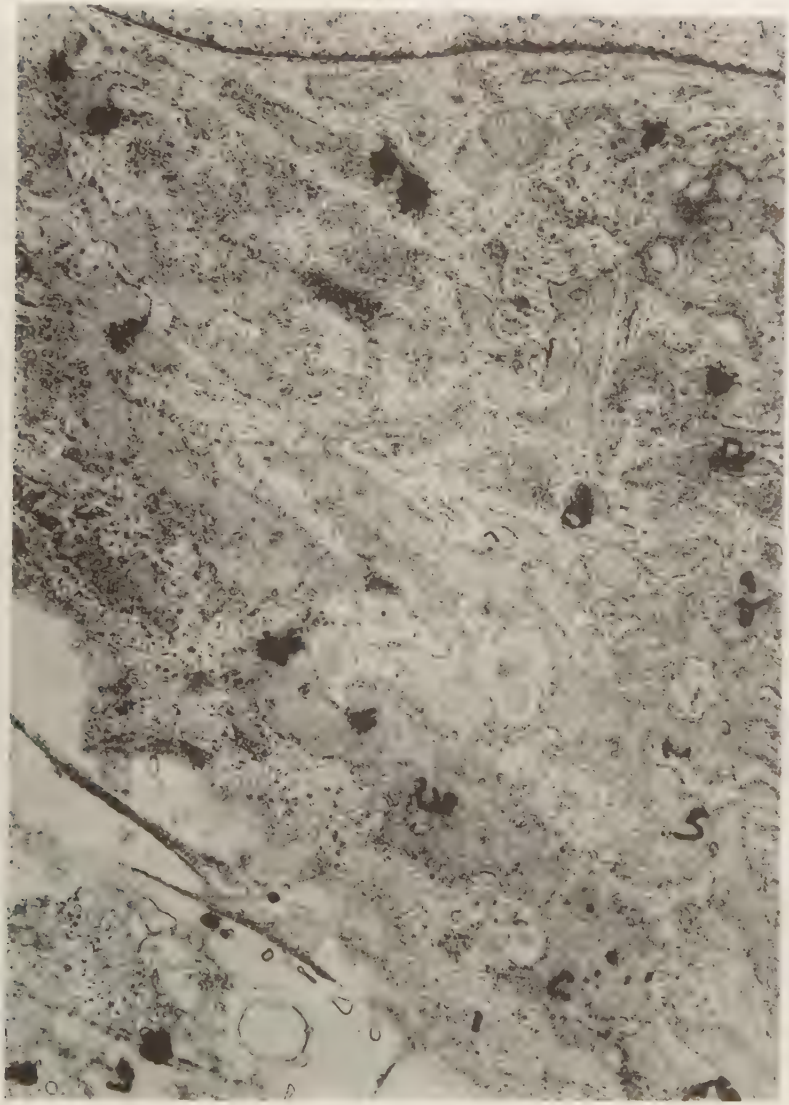


Abb. 26

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit dilatiertem rER *15 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Der größte Teil der Silberkörner befindet sich über den erweiterten rER-Cisternen.

16.000 x

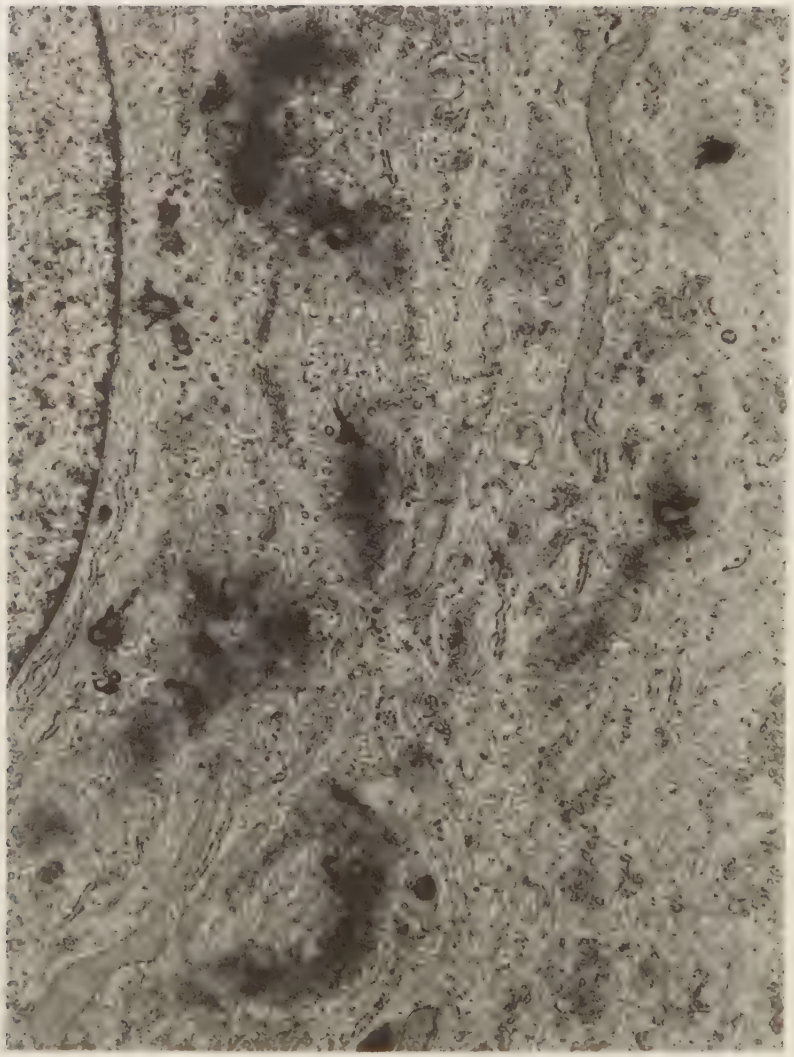


Abb. 27

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit normalem rER *30 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Die Elemente des Golgi-Apparates sind deutlich markiert.

16.000 x

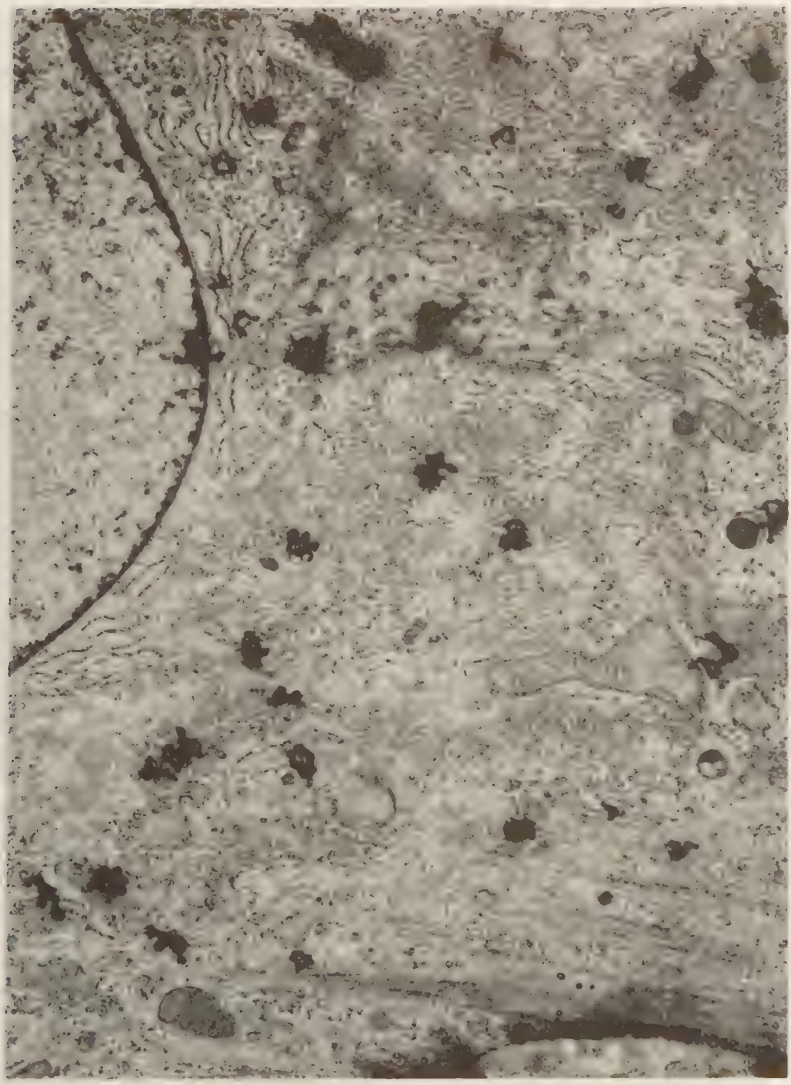


Abb. 28

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit dilatiertem rER *30 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Die meisten Silberkörner sind noch immer über dem erweiterten rER zu lokalisieren.

16.000 x

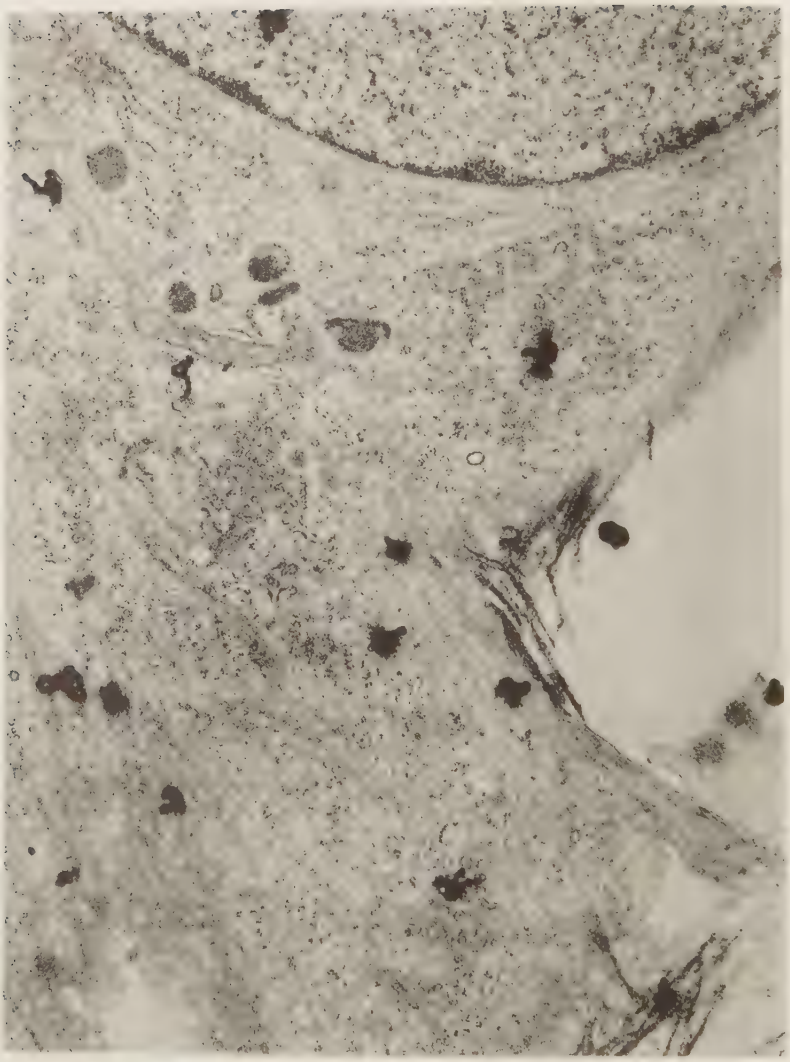


Abb. 29

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit normalem rER *60 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Der größte Teil der Silberkörner befindet sich hier bereits im peripheren Cytoplasma, sowie im zellassoziierten Fasermaterial.

16.000 x

Abb. 30

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit dilatiertem rER *60 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Die erweiterten Cisternen des rER zeigen keine Markierung mehr. Der Hauptanteil des radioaktiven Materials befindet sich nun im Golgi-Apparat.

16.000 x

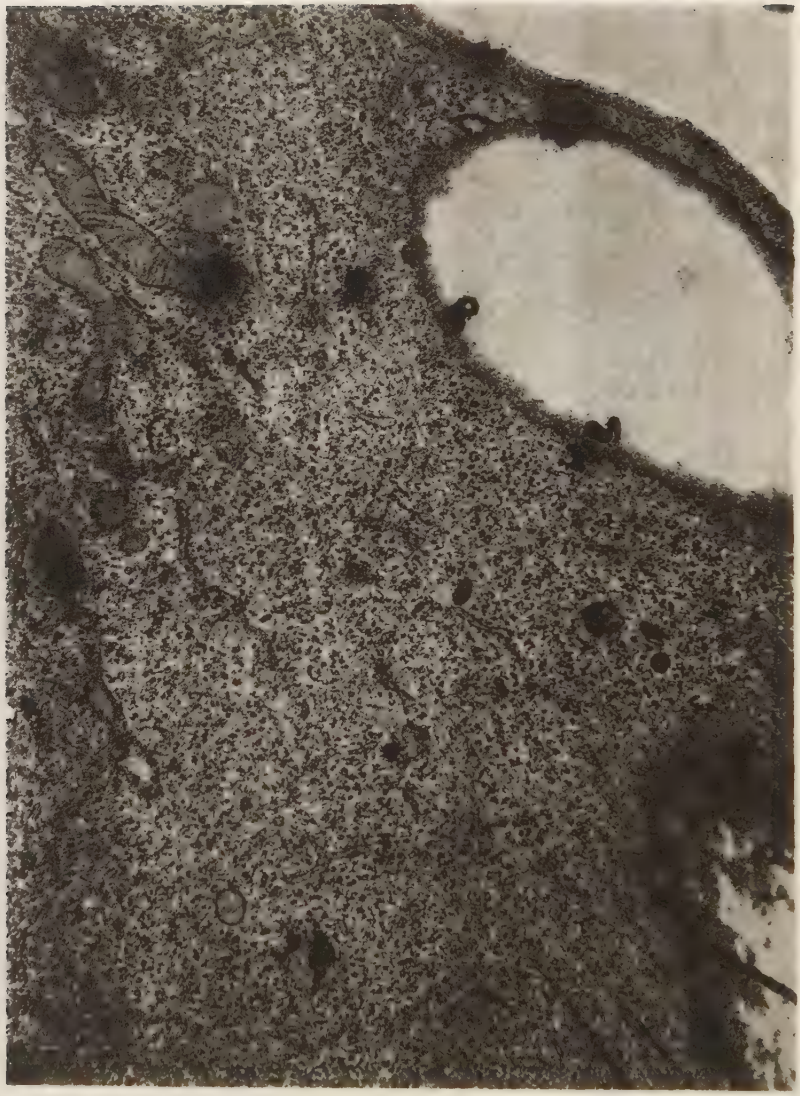


Abb. 31

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit normalem rER *120 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Die meisten Silberkörner befinden sich über der Cytoplasmamembran.

16.000 x

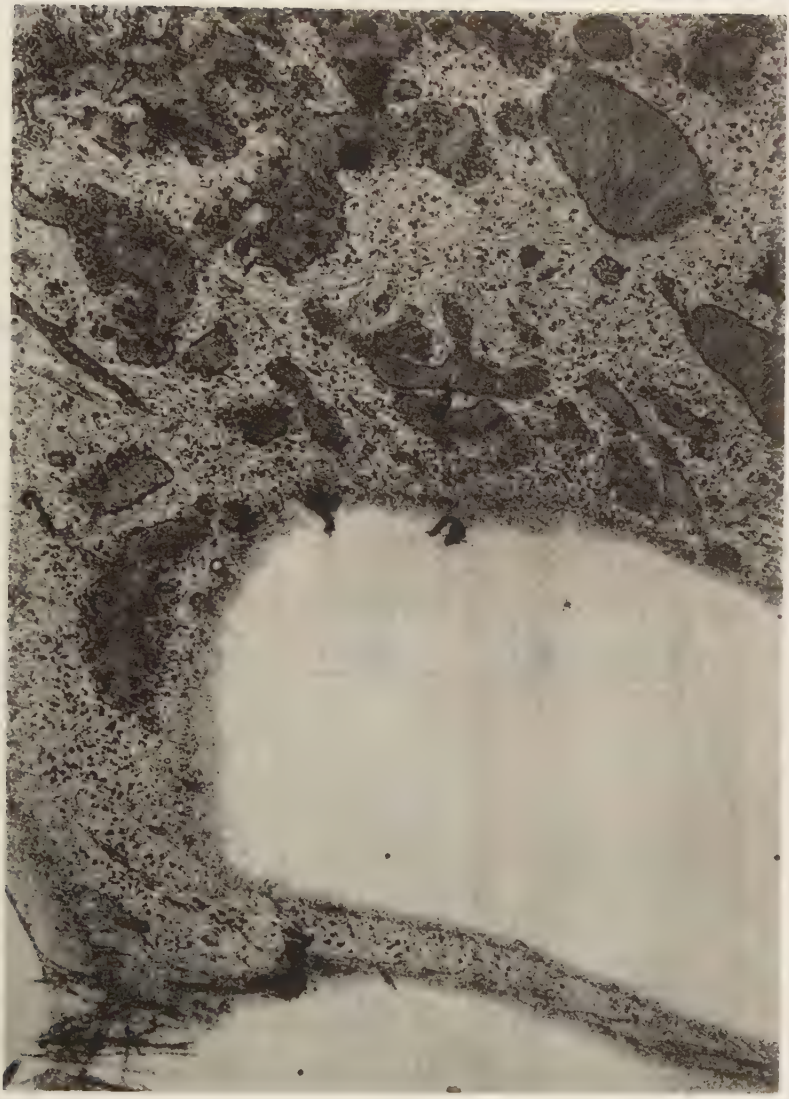


Abb. 32

Silberkornverteilung in Fibroblasten mit dilatiertem rER *120 Minuten* nach Aufnahme von ^{3}H-Prolin. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die meisten Silberkörner im peripheren Cytoplasma und im Bereich der Zellmembran.

16.000 x

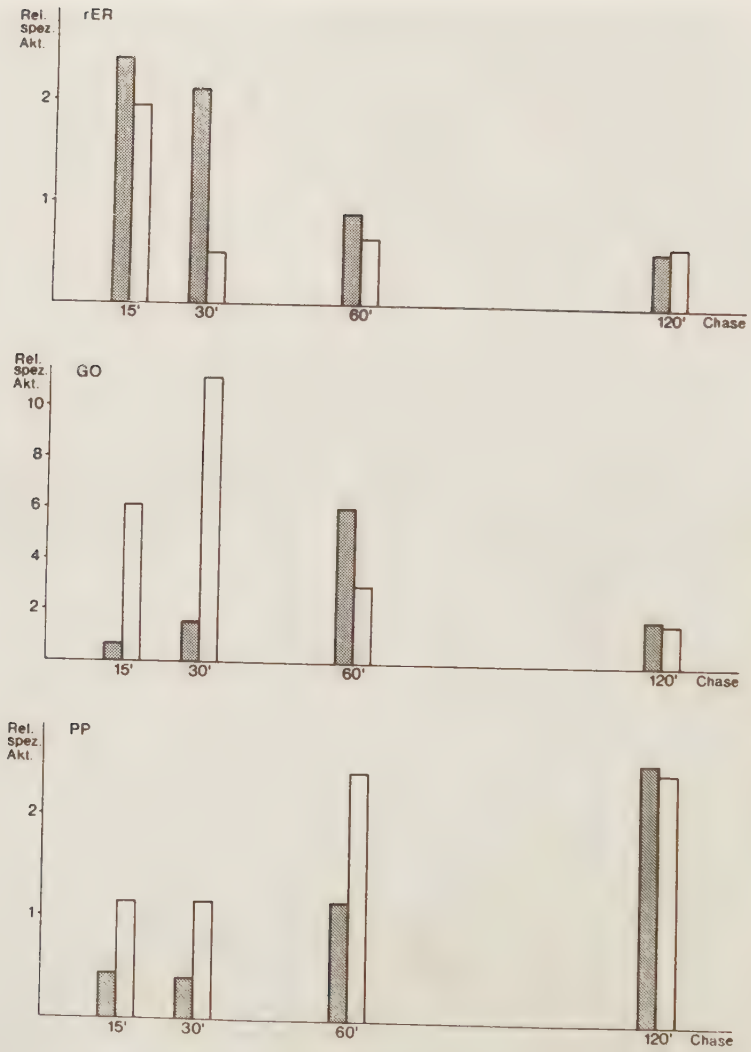


Abb. 33

Mittlere relative spezifische Aktivitäten im rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER), Golgi-Apparat (GO) und peripheren Cytoplasma (PP) von Fibroblasten mit normalem rER (weiße Säulen) und erweitertem rER (graue Säulen). Zeitlicher Verlauf nach einem 5-Minuten-Pulse mit ^{3}H-Prolin.

(Autoradiographie I; Details s. Tab. 5-12)

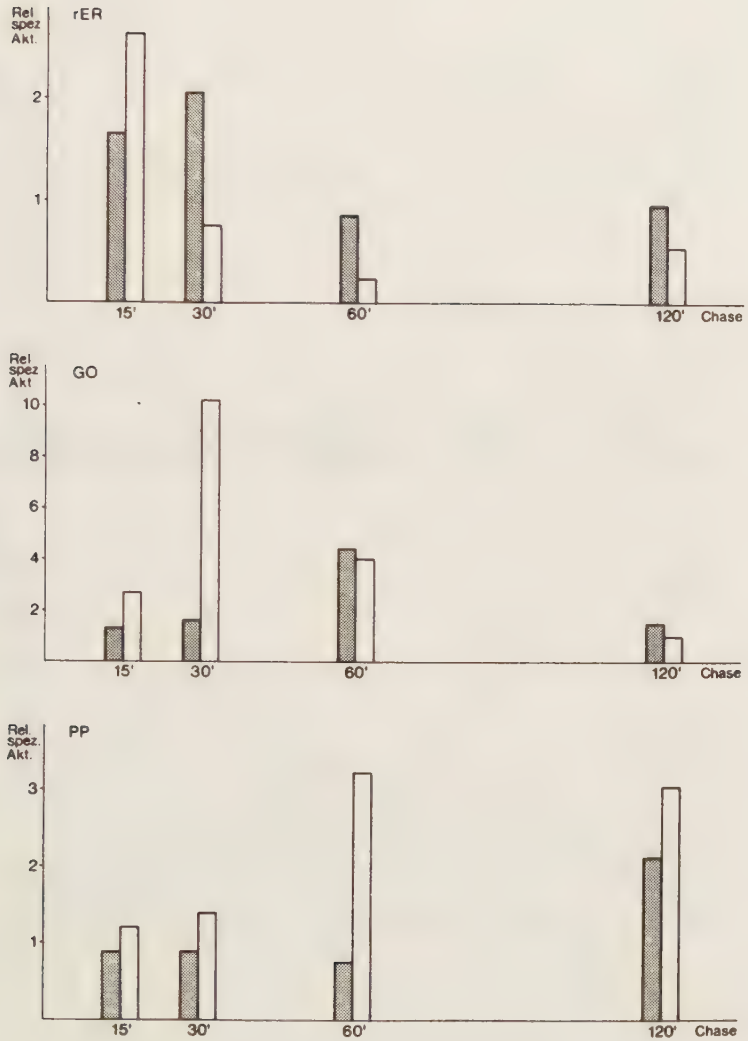


Abb. 34

Mittlere relative spezifische Aktivitäten im rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER), Golgi-Apparat (GO) und peripheren Cytoplasma (PP) von Fibroblasten mit normalem rER (weiße Säulen) und erweitertem rER (graue Säulen). Zeitlicher Verlauf nach einem 5-Minuten-Pulse mit ^{3}H-Prolin.

(Autoradiographie II; Details s. Tab. 13-20)

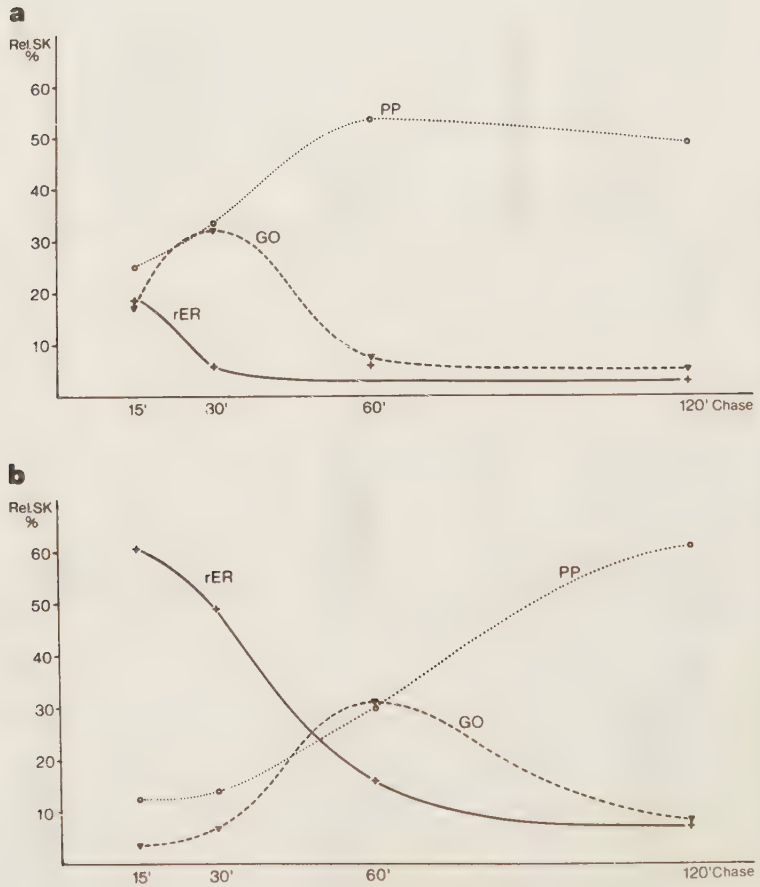


Abb. 35

Prozentuale Verteilung der Silberkörner über den Zellkompartimenten rauhes endoplasmatisches Reticulum (rER), Golgi-Apparat (GO) und peripheres Cytoplasma (PP) im zeitlichen Verlauf nach Markierung mit ^{3}H-Prolin
a) in Fibroblasten mit normalem rER
b) in Fibroblasten mit erweitertem rER

(Autoradiographie I)

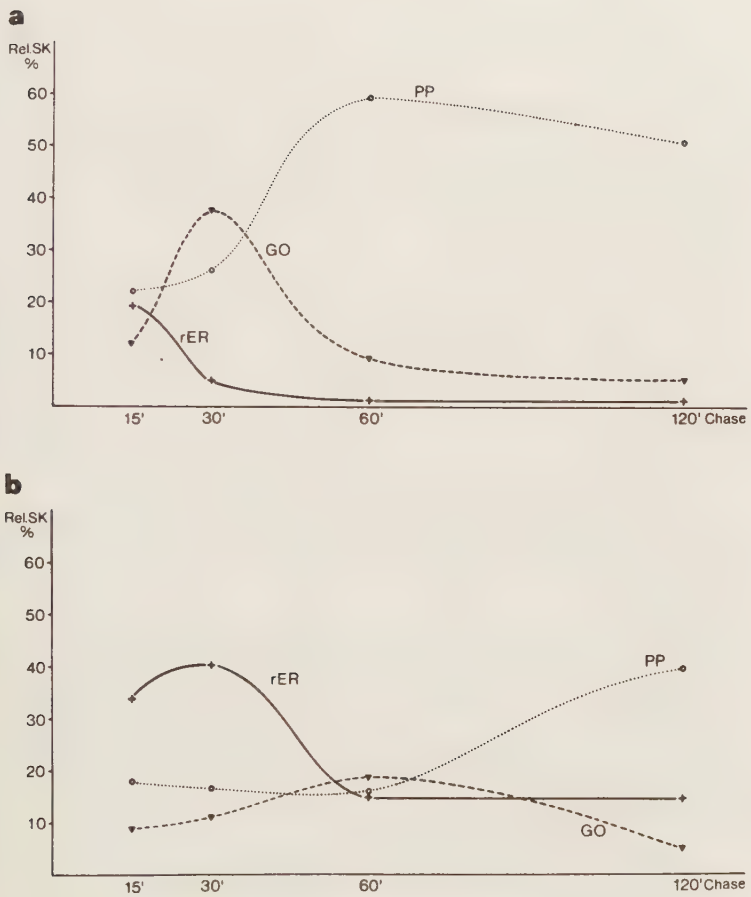


Abb. 36

Prozentuale Verteilung der Silberkörner über den Zellkompartimenten rauhes endoplasmatisches Reticulum (rER), Golgi-Apparat (GO) und peripheres Cytoplasma (PP) im zeitlichen Verlauf nach Markierung mit ^{3}H-Prolin
a) in Fibroblasten mit normalem rER
b) in Fibroblasten mit erweitertem rER

(Autoradiographie II)

IX. Tabellen

Tab. 1
Relative Flächenanteile der einzelnen Kompartimente am Gesamtzellquerschnitt bei Fibroblasten mit normalem und dilatiertem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER).

Tab. 2
Zellzahlen/Schale und ^{3}H-Prolinaufnahmeraten nach einem 5-Minuten-"Pulse" mit ^{3}H-Prolin (500 µCi/ml) aus 5 biochemischen Versuchen.

Tab. 3-4
Intrazelluläres und extrazelluläres ^{3}H-Protein in Fibroblasten mit normalem und dilatiertem rER im zeitlichen Verlauf nach einem 5-Minuten-"Pulse" mit ^{3}H-Prolin (50 µCi/ml).

Tab. 5-20
Vollständige Daten der beiden Autoradiographien. Jeder der in den Tabellen verzeichneten Werte entspricht der Summe der Einzelwerte von jeweils 5 Zellen mit normalem bzw. erweitertem rauhem endoplasmatischen Reticulum (rER) für die "Chase"-Zeiten 15, 30, 60 und 120 Minuten.

Angegeben sind für jedes Kompartiment:
- Anzahl von HR-Kreisen als erwartete Kornverteilung in 5 Zellen
- Beobachtete Anzahl von Silberkörnern (SK) in 5 Zellen
- Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung, d.h. nach Normierung der beobachteten SK nach den HR-Kreisen gegen die beobachtete Anzahl von Sk
- χ^2-Wert nach Anpassungstest der erwarteten Anzahl von SK gegen die beobachtete Anzahl von SK
- Relative spezifische Aktivität als Mittelwert von jeweils 5 Zellen und Standardabweichung

a

	15'		30'		60'		120'		
	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	$\bar{x}$
GP	0,44	0,43	0,31	0,48	0,37	0,47	0,46	0,46	0,43 ± 0,06
rER	0,09	0,09	0,12	0,07	0,09	0,06	0,06	0,04	0,08 ± 0,02
GO	0,03	0,03	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,05	0,03 ± 0,01
PP	0,22	0,19	0,29	0,18	0,22	0,18	0,21	0,17	0,21 ± 0,04
MI	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,05	0,06 ± 0,01
N	0,16	0,21	0,17	0,17	0,23	0,20	0,16	0,23	0,19 ± 0,03

b

	15'		30'		60'		120'		
	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	AR_I	AR_{II}	$\bar{x}$
GP	0,22	0,33	0,11	0,28	0,23	0,30	0,37	0,41	0,28 ± 0,09
rER	0,25	0,21	0,24	0,20	0,20	0,18	0,15	0,16	0,20 ± 0,04
GO	0,05	0,07	0,04	0,07	0,05	0,05	0,03	0,03	0,05 ± 0,02
PP	0,25	0,19	0,35	0,19	0,28	0,22	0,24	0,19	0,24 ± 0,06
MI	0,06	0,05	0,05	0,04	0,07	0,05	0,06	0,06	0,06 ± 0,01
N	0,15	0,15	0,22	0,22	0,16	0,21	0,15	0,14	0,18 ± 0,04

Tab. 1

Relative Flächenanteile (= HR-Kreise$_{i_x}$/HR-Kreise$_{ges.}$) der einzelnen Kompartimente am Gesamtzellquerschnitt. Teilergebnisse der Autoradiographien I und II für die Chase-Zeiten 15, 30, 60 und 120 Minuten.

a) Fibroblasten mit normalem rER

b) Fibroblasten mit dilatiertem rER

Versuch	Normales rER		Dilatiertes rER	
	Zellen/Schale	cpm/10^5 Zellen	Zellen/Schale	cpm/10^5 Zellen
1	250.000	23.100	105.000	14.900
2	217.000	20.200	250.000	9.200
3	214.000	8.600	263.000	2.200
4	245.000	5.100	300.000	3.200
5	230.000	7.000	258.000	5.100

Tab. 2

Zellzahlen/Schale und ^{3}H-Prolin-Aufnahmeraten in cpm/10^5 Zellen nach einem 5-Minuten-Pulse mit 500 µCi ^{3}H-Prolin/ml (5×10^{-6} mol/l) bei Fibroblasten mit normalem und dilatiertem rER. Die Markierung der Fibroblasten für die Autoradiographien I und II erfolgte parallel zu den Versuchen 1 und 2.

		0'	15'	30'	1 h	2 h	5 h	10 h	24 h
1	N	1378 ± 185	1054 ± 19	3598 ± 187	4993 ± 448	3507 ± 475	1878 ± 88	1060 ± 87	947 ± 141
	D	330 ± 113	318 ± 55	1292 ± 163	2687 ± 184	1736 ± 120	804 ± 166	647 ± 49	467 ± 51
2	N	449 ± 77	1374 ± 131	1228 ± 71	561 ± 29	530 ± 26	128 ± 37		557 ± 55
	D	77 ± 11	97 ± 10	138 ± 47	311 ± 78	248 ± 96	235 ± 99	280 ± 33	112 ± 32
3	N	63 ± 9	214 ± 16	332 ± 13	382 ± 8	469 ± 26	115 ± 9	218 ± 12	191 ± 35
	D	36 ± 7	34 ± 4	54 ± 13	81 ± 6	131 ± 16	51 ± 9	57 ± 9	74 ± 6
4	N	532 ± 30	985 ± 43	1043 ± 67	1157 ± 24	401 ± 159		392 ± 20	547 ± 31
	D	22 ± 9	54 ± 1	52 ± 6	171 ± 106	198 ± 73	95 ± 40	59 ± 10	68 ± 9
5	N	151 ± 13	270 ± 29	433 ± 37	391 ± 36	419 ± 31	290 ± 23	284 ± 18	424 ± 43
	D	84 ± 14	89 ± 8	195 ± 25	329 ± 26	440 ± 34	292 ± 17	146 ± 27	78 ± 4

Tab. 3

Intrazelluläres, TCA-fällbares ^{3}H-Protein in cpm/10^{5} Zellen bei Fibroblasten mit normalem rER (N) und mit dilatiertem rER (D), gemessen 0', 15', 30', 1 h, 2 h, 5 h, 10 h und 24 h nach einem 5-Minuten-Pulse mit ^{3}H-Prolin (50 µCi/ml). Ergebnisse aus 5 biochemischen Versuchen. Die maximalen ^{3}H-Prolin-Konzentrationen im Chase-Verlauf sind gekennzeichnet. (n=3)

		0'	15'	30'	1 h	2 h	5 h	10 h	24 h
1	N	6 ± 2	11 ± 4	48 ± 15	714 ± 42	1008 ± 183	840 ± 143	526 ± 50	635 ± 145
	D	3 ± 3	6 ± 6	38 ± 23	219 ± 4	686 ± 33	650 ± 104	723 ± 11	632 ± 136
2	N	16 ± 7	36 ± 4	65 ± 4	114 ± 65	163 ± 81	41 ± 11		156 ± 15
	D	4 ± 1	8 ± 1	10 ± 2	49 ± 10	88 ± 4	125 ± 4	229 ± 17	119 ± 14
3	N	4 ± 1	10 ± 2	28 ± 1	86 ± 8	170 ± 4	52 ± 3	150 ± 41	86 ± 11
	D	5 ± 1	4 ± 1	8 ± 2	19 ± 4	44 ± 1	42 ± 9	69 ± 12	83 ± 14
4	N	12 ± 2	16 ± 3	57 ± 1	170 ± 35	105 ± 36		132 ± 5	177 ± 11
	D	3 ± 1	10 ± 7	16 ± 12	20 ± 16	40 ± 11	47 ± 16	92 ± 18	74 ± 13
5	N	5 ± 1	11 ± 3	23 ± 2	105 ± 10	185 ± 5	168 ± 12	155 ± 12	187 ± 21
	D	4 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	36 ± 3	115 ± 14	167 ± 7	113 ± 16	106 ± 9

Tab. 4

Extrazelluläres, TCA-fällbares ^{3}H-Protein in cpm/10^{5} Zellen bei Fibroblasten mit normalem rER (N) und mit dilatiertem rER (D), gemessen 0', 15', 30', 1 h, 2 h, 5 h, 10 h und 24 h nach einem 5-Minuten-Pulse mit ^{3}H-Prolin (50 µCi/ml). Ergebnisse aus 5 biochemischen Versuchen. Die maximalen ^{3}H-Prolin-Konzentrationen im Chase-Verlauf sind gekennzeichnet. (n=3)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	817	817	71	71	120,6	120,6	20,40	0,64 ± 0,22
rER	10		9		1,5			
rER/GP	149		36		22,0			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	2	173	1	47	0,3	25,5	18,13	1,93 ± 0,52
rER/MI/GP	7		1		1,0			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	5		-		0,7			
GO	17		13		2,5			
GO/GP	42		30		6,2			
GO/MI/GP	3	62	3	46	0,4	9,1	149,63	6,09 ± 2,68
GO/N/GP	-		-		-			
PP	244		45		36,0			
PP/EX	164	408	28	73	24,2	60,2	2,72	1,15 ± 0,42
MI	2		-		0,3			
MI/GP	94	96	12	12	13,9	14,2	0,34	0,69 ± 0,27
MI/PP	-		-		-			
N	270		19		39,8			
N/GP	21	294	5	24	3,1	43,4	8,67	0,68 ± 0,41
N/MI/GP	3		-		0,4			
Gesamt	1850		273		272,9			

Tab. 5

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 15 Minuten
(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	419	419	70	70	101,7	101,7	9,88	0,69 ± 0,19
rER	118		109		28,6			
rER/GP	318		148		77,2			
rER/PP	1		2		0,2			
rER/GO/GP	7	479	8	275	1,7	116,3	216,56	2,39 ± 0,29
rER/MI/GP	28		8		6,8			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	7		-		1,7			
GO	48		7		11,6			
GO/GP	46		9		11,2			
GO/MI/GP	5	99	-	16	1,2	24,0	2,67	0,67 ± 0,33
GO/N/GP	-		-		-			
PP	306		41		74,3			
PP/EX	170	476	12	53	41,3	115,5	33,82	0,46 ± 0,26
MI	-		-		-			
MI/GP	122	122	13	13	29,6	29,6	9,31	0,46 ± 0,16
MI/PP	-		-		-			
N	272		29		66,0			
N/GP	14	288	1	30	3,4	69,9	22,78	0,49 ± 0,08
N/MI/GP	2		-		0,5			
Gesamt	1883		457		457,0			

Tab. 6

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 15 Minuten

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	624	624	48	48	137,8	137,8	58,52	0,38 ± 0,20
rER	49		7		10,8			
rER/GP	177		10		39,1			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	2	249	3	24	0,4	55,0	17,47	0,49 ± 0,19
rER/MI/GP	20		4		4,4			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	1		-		0,2			
GO	30		118		6,6			
GO/GP	29		20		6,4			
GO/MI/GP	2	61	3	142	0,4	13,5	1223,13	11,09 ± 2,91
GO/N/GP	-		1		-			
PP	401		105		88,6			
PP/EX	185	586	50	155	40,9	129,4	5,06	1,16 ± 0,24
MI	5		9		1,1			
MI/GP	139	150	18	28	30,7	33,1	0,79	0,82 ± 0,34
MI/PP	6		1		1,3			
N	300		41		66,3			
N/GP	36	336	5	46	8,0	74,2	10,72	0,62 ± 0,23
N/MI/GP	-		-		-			
Gesamt	2006		443		443,0			

Tab. 7

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 30 Minuten
(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	131	131	72	72	77,4	77,4	0,38	1,00 ± 0,46
rER	72		206		42,5			
rER/GP	178		122		105,1			
rER/PP	3		-		1,8			
rER/GO/GP	6	289	7	344	3,5	170,7	175,94	2,09 ± 0,46
rER/MI/GP	20		9		11,8			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	10		-		5,9			
GO	18		35		10,6			
GO/GP	29		17		17,1			
GO/MI/GP	3	50	1	53	1,8	29,5	18,72	1,53 ± 0,53
GO/N/GP	-		-		-			
PP	297		98		175,4			
PP/EX	125	422	8	106	73,8	249,3	82,37	0,41 ± 0,06
MI	2		5		1,2			
MI/GP	42	51	14	20	24,8	30,1	3,39	0,68 ± 0,22
MI/PP	7		1		4,1			
N	241		107		142,4			
N/GP	21	264	11	118	12,4	156,0	9,26	0,78 ± 0,39
N/MI/GP	2		-		1,2			
Gesamt	1207		713		712,8			

Tab. 8

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 30 Minuten
(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	505	505	96	96	178,5	178,5	38,13	0,55 ± 0,13
rER	15		1		5,3			
rER/GP	100		23		35,4			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	1	120	-	25	0,4	42,4	7,14	0,65 ± 0,22
rER/MI/GP	1		1		0,4			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	3		-		1,1			
GO	9		7		3,2			
GO/GP	24		28		8,5			
GO/MI/GP	-	33	1	36	-	11,7	50,47	3,10 ± 1,72
GO/N/GP	-		-		-			
PP	136		80		48,1			
PP/EX	166	302	171	251	58,7	106,8	194,70	2,42 ± 0,53
MI	1		-		0,4			
MI/GP	79	81	13	13	27,9	28,6	8,51	0,44 ± 0,27
MI/PP	1		-		0,4			
N	284		54		100,4			
N/GP	28	314	4	58	9,9	111,0	25,31	0,48 ± 0,21
N/MI/GP	2		-		0,7			
Gesamt	1355		479		479,3			

Tab. 9

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 60 Minuten

(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	422	422	44	44	62,5	62,5	5,48	0.62 ± 0,37
rER	80		14		11,9			
rER/GP	261		28		38,7			
rER/PP	6		-		0,9			
rER/GO/GP	2	376	1	46	0,3	55,7	1,69	0,88 ± 0,34
rER/MI/GP	20		3		3,0			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	7		-		1,0			
GO	42		56		6,2			
GO/GP	49		19		7,3			
GO/MI/GP	4	95	2	77	0,6	14,1	280,60	6,02 ± 1,76
GO/N/GP	-		-		-			
PP	341		59		50,5			
PP/EX	182	523	18	77	27,0	77,5	0,00	1,17 ± 0,59
MI	4		2		0,6			
MI/GP	121	125	14	16	17,9	18,5	0,34	0,94 ± 0,57
MI/PP	-		-		-			
N	283		13		41,9			
N/GP	18	302	-	13	2,7	44,7	22,48	0,51 ± 0,37
N/MI/GP	1		-		0,1			
Gesamt	1843		273		273,1			

Tab. 10

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 60 Minuten
(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	849	849	192	192	327,5	327,5	56,06	0,58 ± 0,16
rER	5		-		1,9			
rER/GP	91		21		35,1			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	1	102	-	22	0,4	39,4	7,68	0,61 ± 0,53
rER/MI/GP	4		1		1,5			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	1		-		0,4			
GO	12		9		4,6			
GO/GP	46		23		17,7			
GO/MI/GP	2	60	3	35	0,8	23,1	6,13	1,71 ± 0,51
GO/N/GP	-		-		-			
PP	174		158		67,1			
PP/EX	214	388	193	341	82,6	149,7	244,46	2,44 ± 0,74
MI	4		5		1,5			
MI/GP	127	131	33	38	49,0	50,5	3,09	0,89 ± 0,36
MI/PP	-		-		-			
N	273		73		105,3			
N/GP	27	300	4	78	10,4	115,7	12,28	0,61 ± 0,36
N/MI/GP	-		1		-			
Gesamt	1830		706		705,8			

Tab. 11

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 120 Minuten

(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	592	592	40	40	93,4	93,4	30,53	0,43 ± 0,04
rER	31		2		4,9			
rER/GP	180		11		28,4			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	7	236	-	16	1,1	37,2	12,08	0,54 ± 0,09
rER/MI/GP	14		3		2,2			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	4		-		0,6			
GO	15		2		2,4			
GO/GP	34		11		5,4			
GO/MI/GP	2	52	-	13	0,3	8,2	2,81	1,86 ± 0,31
GO/N/GP	1		-		0,2			
PP	223		90		35,2			
PP/EX	155	378	61	151	24,4	59,6	140,17	2,55 ± 0,38
MI	3		-		0,5			
MI/GP	88	91	7	7	13,9	14,4	3,80	0,64 ± 0,37
MI/PP	-		-		-			
N	214		24		33,7			
N/GP	24	239	1	25	3,8	37,7	4,28	0,67 ± 0,40
N/MI/GP	1		-		0,2			
Gesamt	1598		252		250,6			

Tab. 12

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 120 Minuten
(Autoradiographie I)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	669	669	130	130	188,8	188,8	18,31	0,69 ± 0,26
rER	6		5		1,7			
rER/GP	112		77		31,6			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	2	132	8	95	0,6	37,3	89,26	2,62 ± 0,94
rER/MI/GP	8		4		2,3			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	4		1		1,1			
GO	12		10		3,4			
GO/GP	40		33		11,3			
GO/MI/GP	-	53	-	43	-	15,0	52,27	2,72 ± 1,70
GO/N/GP	1		-		0,3			
PP	135		62		38,1			
PP/EX	152	287	27	89	42,9	81,0	0,79	1,21 ± 0,40
MI	-		1		-			
MI/GP	79	80	16	17	22,3	22,6	1,39	0,87 ± 0,51
MI/PP	1		-		0,3			
N	301		57		84,9			
N/GP	23	324	5	62	6,5	91,4	9,46	0,67 ± 0,34
N/MI/GP	-		-		-			
Gesamt	1545		436		436,1			

Tab. 13

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 15 Minuten
(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	475	475	73	73	94,1	94,1	4,73	0,76 ± 0,28
rER	47		18		9,3			
rER/GP	218		64		43,2			
rER/PP	-		1		-			
rER/GO/GP	7	298	6	93	1,4	59,1	19,45	1,66 ± 0,34
rER/MI/GP	16		3		3,2			
rER/MI/PP	2		-		0,4			
rER/N/GP	8		1		1,6			
GO	26		4		5,2			
GO/GP	67		20		13,3			
GO/MI/GP	7	100	-	24	1,4	19,8	0,89	1,29 ± 0,39
GO/N/GP	-		-		-			
PP	135		38		26,7			
PP/EX	140	275	11	49	27,7	54,5	0,56	0,88 ± 0,10
MI	3		-		0,6			
MI/GP	61	67	8	8	12,1	13,3	2,11	0,72 ± 0,43
MI/PP	3		-		0,6			
N	199		37		39,4			
N/GP	15	218	-	37	3,0	43,2	0,89	0,97 ± 0,79
N/MI/GP	4		-		0,8			
Gesamt	1433		284		284,0			

Tab. 14

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 15 Minuten
(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	923	923	61	61	158,1	158,1	59,6	0,38 ± 0,07
rER	2		-		0,3			
rER/GP	109		13		18,7			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	3	127	2	17	0,5	21,8	1,1	0,76 ± 0,28
rER/MI/GP	7		1		1,2			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	6		1		1,0			
GO	8		46		1,4			
GO/GP	55		69		9,4			
GO/MI/GP	5	69	4	120	0,9	11,8	992,1	10,19 ± 1,98
GO/N/GP	1		1		0,2			
PP	180		49		30,8			
PP/EX	163	343	27	76	27,9	58,7	5,1	1,38 ± 0,55
MI	3		1		0,5			
MI/GP	115	118	12	13	19,7	20,2	2,6	0,65 ± 0,26
MI/PP	-		-		-			
N	303		39		51,9			
N/GP	29	335	2	41	5,0	57,4	4,7	0,50 ± 0,51
N/MI/GP	3		-		0,5			
Gesamt	1915		328		328,0			

Tab. 15

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 30 Minuten
(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HF-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	441	441	53	53	106,7	106,7	27,03	0,44 ± 0,15
rER	24		19		5,8			
rER/GP	258		102		62,4			
rER/PP	1		2		0,2			
rER/GO/GP	8	318	21	153	1,9	77,0	75,01	2,04 ± 0,43
rER/MI/GP	23		9		5,6			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	4		-		1,0			
GO	19		4		4,6			
GO/GP	83		42		20,1			
GO/MI/GP	3	106	-	46	0,7	25,7	16,03	1,62 ± 0,76
GO/N/GP	1		-		0,2			
PP	167		44		40,4			
PP/EX	144	311	17	61	34,9	75,3	2,72	0,88 ± 0,28
MI	1		3		0,2			
MI/GP	68	70	10	14	16,5	16,9	0,50	1,56 ± 1,22
MI/PP	1		1		0,2			
N	320		54		77,4			
N/GP	33	353	6	60	8,0	85,4	7,55	0,74 ± 0,20
N/MI/GP	-		-		-			
Total	1599		387		386,8			

Tab. 16

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 30 Minuten

(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	699	699	47	47	151,3	151,3	71,90	0,29 ± 0,05
rER	4		-		0,9			
rER/GP	68		2		14,7			
rER/PP	1		-		0,2			
rER/GO/GP	1	88	-	3	0,2	19,0	13,47	0,23 ± 0,09
rER/MI/GP	12		1		2,6			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	2		-		0,4			
GO	9		4		1,9			
GO/GP	28		20		6,1			
GO/MI/GP	-	37	-	24	-	8,0	32,00	4,00 ± 4,36
GO/N/GP	-		-		-			
PP	143		114		31,0			
PP/EX	127	270	81	195	27,5	58,4	319,51	3,22 ± 0,56
MI	2		1		0,4			
MI/GP	84	89	19	20	18,2	19,3	0,03	1,24 ± 0,99
MI/PP	3		-		0,6			
N	284		32		61,5			
N/GP	14	300	-	32	3,0	64,9	16,68	0,54 ± 0,19
N/MI/GP	2		-		0,4			
Gesamt	1483		321		320,9			

Tab. 17

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 60 Minuten
(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	399	399	177	177	186,5	186,5	0,48	0.94 ± 0,15
rER	17		5		7,9			
rER/GP	188		69		87,9			
rER/PP	-		3		-			
rER/GO/GP	8	237	6	91	3,7	110,6	3,54	0,85 ± 0,18
rER/MI/GP	18		8		8,4			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	6		-		2,8			
GO	9		29		4,2			
GO/GP	47		68		22,0			
GO/MI/GP	5	62	10	114	2,3	29,0	249,14	4,39 ± 1,14
GO/N/GP	1		7		0,5			
PP	175		69		81,8			
PP/EX	119	294	35	104	55,6	137,4	8,12	0,76 ± 0,27
MI	3		2		1,4			
MI/GP	63	68	26	29	29,4	31,8	0,25	0,86 ± 0,28
MI/PP	2		1		0,9			
N	256		105		119,6			
N/GP	28	286	7	114	13,1	133,7	2,90	0,78 ± 0,42
N/MI/GP	2		2		0,9			
Gesamt	1346		629		628,9			

Tab. 18

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 60 Minuten
(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von SK bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	598	598	127	127	260,3	260,3	68,26	0,44 ± 0,16
rER	-		-		-			
rER/GP	47		7		20,5			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	1	53	-	8	0,4	23,1	9,87	0,56 ± 0,19
rER/MI/GP	5		-		2,2			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	-		1		-			
GO	8		1		3,5			
GO/GP	58		25		25,2			
GO/MI/GP	2	70	-	26	0,9	30,5	0,66	1,00 ± 0,41
GO/N/GP	2		-		0,9			
PP	104		156		45,3			
PP/EX	118	222	122	278	51,4	96,6	340,64	3,04 ± 1,06
MI	1		-		0,4			
MI/GP	59	62	24	25	25,7	27,0	0,15	1,10 ± 0,79
MI/PP	2		1		0,9			
N	287		104		124,9			
N/GP	20	307	3	107	8,7	133,6	5,30	0,83 ± 0,06
N/MI/GP	-		-		-			
Gesamt	1312		571		571,2			

Tab. 19

Fibroblasten mit normalem rER; "Chase"-Dauer 120 Minuten

(Autoradiographie II)

Kompartiment	Anzahl von HR-Kreisen		Beobachtete Anzahl von SK		Erwartete Anzahl von Sk bei Zufallsverteilung		χ^2	Relative spezifische Aktivität
GP	746	746	133	133	246,3	246,3	52,12	0,54 ± 0,02
rER	35		4		11,6			
rER/GP	235		80		77,6			
rER/PP	-		-		-			
rER/GO/GP	9	298	1	89	3,0	98,4	0,90	0,97 ± 0,30
rER/MI/GP	16		3		5,3			
rER/MI/PP	-		-		-			
rER/N/GP	3		1		1,0			
GO	10		-		3,3			
GO/GP	49		31		16,2			
GO/MI/GP	3	62	-	31	1,0	20,5	5,38	1,50 ± 0,38
GO/N/GP	-		-		-			
PP	184		169		60,8			
PP/EX	155	339	73	242	51,2	111,9	151,26	2,12 ± 0,62
MI	9		2		3,0			
MI/GP	93	103	30	34	30,7	34,0	0,00	1,06 ± 0,36
MI/PP	1		2		0,3			
N	242		59		79,9			
N/GP	18	260	9	68	5,9	85,9	3,73	0,75 ± 0,43
N/MI/GP	-		-		-			
Gesamt	1808		597		597,1			

Tab. 20

Fibroblasten mit dilatiertem rER; "Chase"-Dauer 120 Minuten
(Autoradiographie II)

Diese Arbeit entstand im Diabetes Forschungsinstitut
an der Universität Düsseldorf unter finanzieller
Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft,
des Landes NRW, sowie der Paul-Kuth-Stiftung.

Danksagung

Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger, meiner Referentin, danke ich für ihr freundliches Engagement und die vielen anregenden Diskussionen insbesondere bei den vielen Fragen und Problemen der autoradiographischen Methodik sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. W. Peters, meinem Korreferenten, danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Th. Koschinsky für die Überlassung des Themas und die zahlreichen Hinweise, Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. A. Gries danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dipl.-Biol. C. Bünting für die Anzüchtung der untersuchten Zellen sowie für ihre Hilfe bei der Durchführung der biochemischen Versuche, Frau R. Zirfas und Frau L. Schröder für die Fotoarbeiten und Herrn Dipl.-Ing. W. Niechoj für die Unterstützung bei der Anfertigung der Graphiken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. B. Schwippert. Bei ihr fand ich stets fachgerechte Hilfe bei den zeitaufwendigen Präparationen zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie den biochemischen Versuchen und den Vorbereitungen in der Zellkultur. Bei der Lösung vieler Probleme in der Planung und Durchführung der Arbeit war sie mir eine unermüdliche, hilfreiche Ansprechpartnerin.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Ehemann danken, ohne deren geduldige Hilfe bei der Betreuung meiner Kinder mir die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Geburtstag, -ort:	20.12.1954 in Gelsenkirchen	
Eltern:	Werner Pawelzik, Brunhilde Pawelzik, geb. Materna	
Familienstand:	verheiratet seit 30.3.1978 2 Kinder, Maren geb. am 17.9.1982 und Lena Kristin geb. am 30.9.1985	
Schulbildung:	1961-1965	Volksschule Wanne-Eickel
	1965-1967	Städt. Neusprachl. Mädchengymnasium Wanne-Eickel
	1967-1973	Luisenschule Mülheim/Ruhr
	1973	Abitur
Hochschul-ausbildung:	1973-1979	Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf
	1976	Diplom-Vorprüfung
	1978	mündliche Diplomprüfung in den Fächern Zoologie, Pflanzenphysiologie und Physik
	1978-1979	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn im Institut für Zoologie II der Universität Düsseldorf über das Thema: " Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Nematoden Trichinella spiralis".
	1980-1983	Wissenschaftliche Angestellte in der Klin. Abteilung des Diabetes Forschungsinstitutes
	seit 1980	Anfertigung einer Dissertation bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Th. Koschinsky in der Klin. Abt. und bei Frau Priv.-Doz. Dr. E. Junger in der Biochemischen Abt. des Diabetes

Forschungsinstitutes über das Thema: " Dilatation des rauhen endoplasmatischen Retikulums als morphologisches Korrelat einer Störung im Proteinstoffwechsel. Untersuchungen an Fibroblasten mittels quantitativer elektronenmikroskopischer Autoradiographie."

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606